



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



⑪ Veröffentlichungsnummer: **0 590 530 A2**

⑫

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

⑲ Anmeldenummer: 93115418.1

⑳ Anmeldetag: 24.09.93

⑤① Int. Cl.<sup>5</sup>: **C12N 15/62, C07K 15/28,  
C12N 9/00, C12N 15/81,  
A01K 67/027, A61K 37/02,  
G01N 33/68, C12N 1/21,  
C12N 5/10**

③① Priorität: 02.10.92 DE 4233152

④③ Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
06.04.94 Patentblatt 94/14

⑥④ Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU NL  
PT SE**

⑦① Anmelder: **BEHRINGWERKE  
Aktiengesellschaft  
Postfach 1140  
D-35001 Marburg(DE)**

⑦② Erfinder: **Gehrmann, Mathias  
Wingertstrasse 11  
D-35457 Lollar(DE)  
Erfinder: Seemann, Gerhard  
Weissdornweg 32  
D-35041 Marburg(DE)  
Erfinder: Bosslet, Klaus  
An der Haustatt 64  
D-35037 Marburg(DE)  
Erfinder: Czech, Jörg  
Höhenweg 3  
D-35041 Marburg(DE)**

⑤④ **Fusionsproteine zur Prodrug-Aktivierung.**

⑤⑦ Die Erfindung betrifft Verbindungen, die eine Antigenbinderegion enthalten, welche an mindestens ein Enzym gebunden ist, das eine nicht oder wenig zytotoxische Verbindung (Prodrug) in eine zytotoxische Verbindung (Drug) metabolisieren kann, wobei die Antigenbinderegion aus einer einzigen Polypeptidkette besteht. Vorteilhafterweise befinden sich an der Polypeptidkette kovalent gebundene Kohlenhydrate.

EP 0 590 530 A2

Die Erfindung betrifft Verbindungen, die eine Antigenbinderegion enthalten, welche an mindestens ein Enzym gebunden ist, das eine nicht oder wenig zytotoxische Verbindung (Prodrug) in eine zytotoxische Verbindung (Drug) metabolisieren kann, wobei die Antigenbinderegion aus einer einzigen Polypeptidkette besteht. Vorteilhafterweise befinden sich an der Polypeptidkette kovalent gebundene Kohlenhydrate.

Die Kombination von Prodrug und Antikörper-Enzym-Konjugaten zur Anwendung als therapeutisches Mittel ist in der Fachliteratur bereits beschrieben. Hierbei werden gegen ein bestimmtes Gewebe gerichtete Antikörper, an die ein Prodrug-spaltendes Enzym gebunden ist, einem Organismus injiziert, und anschließend wird eine enzym-aktivierbare Prodrug-Verbindung verabreicht. Unter der Einwirkung des am Zielgewebe gebundenen Antikörper-Enzym-Konjugates soll die Prodrug-Verbindung in eine Verbindung umgewandelt werden, die eine zytotoxische Wirkung gegen das gebundene Gewebe ausübt. Allerdings hat sich bei Arbeiten mit Antikörper-Enzym-Konjugaten gezeigt, daß diese chemischen Konjugate eine ungünstige Pharmakokinetik besitzen, so daß eine ortsspezifische tumorselektive Spaltung der Prodrug nur unzureichend erfolgt. Manche Autoren haben versucht, diesen offensichtlichen Mangel durch zusätzliche Injektion eines anti-Enzymantikörpers, der eine schnelle Eliminierung des Antikörperenzymkonjugates aus dem Plasma bewirken soll, zu beheben (Sharma et al., Brit. J. Cancer, 61, 659, 1990). Ein weiteres Problem von Antikörperenzymkonjugaten ist die begrenzte Möglichkeit, große Mengen reproduzierbar und homogen herzustellen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war nun, Fusionsproteine zu finden, die in großtechnischem Maßstab hergestellt werden können und aufgrund ihrer pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften für therapeutische Anwendungen geeignet sind.

Es wurde dabei gefunden, daß Verbindungen, die eine Antigenbinderegion enthalten, welche aus einer einzigen Polypeptidkette besteht, für die Herstellung und Verwendung von Fusionsproteinen, welche vorteilhaft mit Kohlenhydraten besetzt sind, bei der Prodrug-Aktivierung unerwartete Vorteile besitzen.

Gegenstand der Erfindung sind daher Verbindungen, die eine Antigenbinderegion enthalten, welche an mindestens ein Enzym gebunden ist, wobei die Antigenbinderegion aus einer einzigen Polypeptidkette besteht und das Fusionsprotein vorteilhaft mit Kohlenhydraten besetzt ist.

Unter Antigenbinderegion versteht man im Sinne der Erfindung eine Region, die mindestens zwei variable Domänen eines Antikörpers enthält, vorzugsweise eine variable Domäne einer schweren Antikörperkette und eine variable Domäne einer leichten Antikörperkette (sFv-Fragment). Die Antigenbinderegion kann jedoch auch bi- oder multivalent aufgebaut sein, d.h. zwei oder mehr Binderegionen besitzen, wie beispielsweise in der EP-A-0 404 097 offenbart. Besonders bevorzugt ist jedoch ein humanes oder humanisiertes sFv-Fragment, insbesondere ein humanisiertes sFv-Fragment.

Vorzugsweise bindet die Antigenbinderegion an ein tumorassoziiertes Antigen (TAA), wobei insbesondere folgende TAAs bevorzugt sind:

neural cell adhesion molecule (N-CAM),  
polymorphic epithelial mucin (PEM),  
epidermal growth factor receptor (EGF-R),  
Thomsen Friedenreich antigen  $\beta$  (TF $\beta$ ),  
gastrointestinal tract carcinoma antigen (GICA),  
ganglioside GD<sub>3</sub> (GD<sub>3</sub>),  
ganglioside GD<sub>2</sub> (GD<sub>2</sub>),  
Sialyl-Le<sup>a</sup>, Sialyl-Le<sup>x</sup>,  
TAG72,  
das durch MAk L6 definierte Glykoprotein mit 24-25 kDa,  
CA 125 und vor allem das  
carcinoembryonic antigen (CEA).

Als Enzyme sind diejenigen Enzyme bevorzugt, die eine nicht oder wenig zytotoxische Verbindung in eine zytotoxische Verbindung metabolisieren können. Beispiele sind die  $\beta$ -Lactamase, Pyroglutamat-Aminopeptidase, Galactosidase oder D-Aminopeptidase wie z.B. in der EP-A2-0 382 411 oder EP-A2-0 392 745 beschrieben, eine Oxidase wie z.B. Ethanoloxidase, Galactoseoxidase, D-Aminosäureoxidase oder  $\alpha$ -Glycerol-Phosphatoxidase, wie z.B. in der WO 91/00108 beschrieben, eine Peroxidase gemäß z.B. EP-A2-0 361 908, eine Phosphatase, wie z.B. in EP-A1-0 302 473 beschrieben, eine Hydroxynitrilase oder Glucosidase gemäß z.B. WO 91/11201, eine Carboxypeptidase, wie z.B. die Carboxypeptidase G2 (WO 88/07378), eine Amidase, wie z.B. die Penicillin-5-amidase (Kerr, D. E. et al. Cancer Immunol. Immunther. 1990, 31), eine Protease, Esterase oder Glycosidase, wie die bereits erwähnte Galactosidase, Glucosidase oder eine Glucuronidase, wie z.B. in der WO 91/08770 beschrieben. Bevorzugt ist eine  $\beta$ -Glucuronidase, vorzugsweise aus *Kobayasia nipponica* oder *Secale cereale* und besonders bevorzugt aus *E. coli* oder eine humane  $\beta$ -Glucuronidase. Die Substrate der einzelnen Enzyme sind in den genannten Schutzrechten

mit angegeben und sollen auch zum Offenbarungsgehalt der vorliegenden Anmeldung gehören. Bevorzugte Substrate der  $\beta$ -Glucuronidase sind N-(D-Glycopyranosyl)-benzyloxycarbonyl-anthracycline und insbesondere das N-(4-Hydroxy-3-nitro-benzyloxycarbonyl)-doxorubicin bzw. daunorubicin- $\beta$ -D-glucuronid (J. C. Florent et al. (1992) Int. Carbohydr. Symp. Paris, A262, 297 oder S. Andrianomenjanahary et al. (1992) Int. Carbohydr. Symp. Paris, A 264, 299).

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Nukleinsäuren, die für die erfindungsgemäßen Verbindungen kodieren. Insbesondere bevorzugt ist eine Nukleinsäure sowie deren Varianten und Mutanten, die für ein humanisiertes sFv-Fragment gegen CEA (Carcinoembryonales Antigen) verbunden mit einer humanen  $\beta$ -Glucuronidase kodiert (sFv-hu $\beta$ -Gluc), vorzugsweise mit der in Tabelle 1 angegebenen Sequenz.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen erfolgt im allgemeinen gentechnisch, nach dem Fachmann allgemein bekannten Verfahren, wobei die Antigenbinderegion mit einem oder mehreren Enzymen entweder direkt oder über einen Linker, vorzugsweise einem Peptidlinker, verbunden sein kann. Als Peptidlinker kann beispielsweise eine "Hinge-Region" eines Antikörpers oder eine "hinge"-ähnliche Aminosäuresequenz verwendet werden. Das Enzym ist dabei vorzugsweise mit dem N-Terminus an die Antigenbinderegion direkt oder über einen Peptidlinker verbunden. Das oder die Enzyme können jedoch auch chemisch, wie z.B. in der WO 91/00108 offenbart, mit der Antigenbinderegion verbunden werden.

Die für die Aminosäuresequenz der erfindungsgemäßen Verbindungen kodierende Nukleinsäure, wird im allgemeinen in einem Expressionsvektor kloniert, in prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszellen, wie z.B. BHK- CHO-, COS-, HeLa-, Insekten-, Tabakpflanzen-, Hefe- oder *E.coli*-Zellen eingebracht und exprimiert. Die so hergestellte Verbindung kann anschließend isoliert und als Diagnostikum oder Therapeutikum verwendet werden. Ein weiteres allgemein bekanntes Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindung ist die Expression der dafür kodierenden Nukleinsäuren in transgenen Säugern mit Ausnahme von Mensch, vorzugsweise in einer transgenen Ziege.

Mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren transfizierte BHK-Zellen exprimierten ein Fusionsprotein (sFv-hu $\beta$ -Gluc), welches sowohl spezifisch für CEA war als auch volle  $\beta$ -Glucuronidase Aktivität besitzt (siehe Bsp. 5).

Dieses Fusionsprotein wurde über Anti-idiotyp Affinitätschromatographie entsprechend der in EP O 501 215 A2 (Beispiel M) beschriebenen Methode gereinigt. Das so gereinigte Fusionsprotein besitzt unter reduzierenden Bedingungen in der SDS-PAGE ein Molekulargewicht von 100 kDa, unter nichtreduzierenden Bedingungen treten Moleküle von 100 bzw. 200 kDa auf.

Gelchromatographie unter nativen Bedingungen (TSK-3000 Gel-chromatographie) zeigte einen Protein-Peak (Bsp. 6, Abb. 1), der mit dem Aktivitätspeak im Spezifitätsenzymaktivitätstest (EP O 501 215 A2) korreliert. Die Position des Peaks im Vergleich zu Standard-Molekulargewichtsmarkern deutet auf ein Molekulargewicht von  $\approx$  200 kDa hin. Dieser Befund, verbunden mit den Daten aus der SDS-PAGE, suggeriert, daß das funktionelle, enzymatisch aktive sFv-hu $\beta$ -Gluc Fusionsprotein als "bivalentes Molekül", d.h. mit 2 Binderegionen und 2 Enzymmolekülen, vorliegt. Hier nicht beschriebene Versuche deuten darauf hin, daß das Fusionsprotein unter bestimmten Kultivierungsbedingungen auch als Tetramer, mit 4 Binderegionen und 4 Enzymmolekülen, vorliegen kann. Nachdem das sFv-hu $\beta$ -Gluc Fusionsprotein gereinigt und in vitro funktionell charakterisiert war, wurde die Pharmakokinetik und die Tumorkalisation des Fusionsproteins in nackten Mäusen bestimmt, die mit menschlichen Magenkarzinomen bestückt waren. Die Mengen an funktionell aktivem Fusionsprotein wurden in den Organen sowie dem Tumor zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach adäquater Aufarbeitung der Organe (Beispiel 7) sowie immunologischer Bestimmung (Triple-Determinanten-Test, Beispiel 8) bestimmt. Die Ergebnisse eines repräsentativen Versuches sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Erstaunlicherweise wird bereits nach 48 Stunden ein Tumor/Plasma Verhältnis von 5/1 erreicht. Zu späteren Zeitpunkten wird dieses Verhältnis noch günstiger und erreicht Werte  $>$  200/1 (Tag 5). Die Ursache für dieses günstige pharmakokinetische Verhalten des sFv-hu $\beta$ -Gluc Fusionsproteins liegt darin, daß nicht am Tumor gebundenes Fusionsprotein hauptsächlich über Rezeptoren für Mannose-6-Phosphat und Galaktose aus dem Plasma und den Normalgeweben durch Internalisation entfernt wird. (Diese Aussage läßt sich dadurch belegen, daß die  $\beta$ -Glucuronidase Werte intrazellulär, z.B. in der Leber, ansteigen).

Wie in Tabelle 5 gezeigt, enthält das sFv-hu $\beta$ -Gluc größere Mengen an Galaktose und vor allem Mannose, die hauptsächlich für die Anbindung an die jeweiligen Rezeptoren verantwortlich sind. Der so entstandene, über die Kohlenhydratreste des Fusionsproteins gebundene Fusionsprotein-Rezeptorkomplex wird dann durch Internalisation aus dem extrazellulären Kompartiment entfernt.

Dieser hauptsächlich über Galaktose und Mannose vermittelte schnelle Internalisationsmechanismus ist maßgeblich an der vorteilhaften Pharmakokinetik des erfindungsgemäßen Fusionsproteins beteiligt. Diese vorteilhafte Pharmakokinetik des mit Galaktose und vor allem Mannose besetzten Fusionsproteins ermög-

licht die i.v. Applikation einer sich extrazellulär verteilenden, hydrophilen Prodrug zu einem relativ frühen Zeitpunkt, ohne eine unspezifische Prodrugaktivierung hervorzurufen. Hierbei ist ein Eliminierungsschritt wie bei Sharma et al. (Brit. J. Cancer, 61. 659, 1990) beschrieben, nicht nötig. Basierend auf den Daten der Tabelle 4 ist die Injektion einer geeigneten Prodrug (S. Adrianomenjanahari et al. 1992, Int. Carbohydrate Symp., Parts A264, 299) schon 3 Tage nach Injektion des sFv-hu $\beta$ -Gluc Fusionsproteins ohne Erzeugung von signifikanten Nebenwirkungen möglich (Daten nicht gezeigt).

Ein ähnlich vorteilhafter Kohlenhydratbesatz auf Fusionsproteinen ist z.B. auch durch sekretorische Expression des sFv-hu $\beta$ -Gluc Fusionsprotein in bestimmten Hefestämmen wie *Saccharomyces cerevisiae* oder *Hansenula polymorpha* zu erzielen. Diese Organismen sind in der Lage, Fusionsproteine, die entsprechende N-Glykosylierungsstellen besitzen, sehr wirkungsvoll zu mannosylieren (Goochee et al., Biotechnology, 9, 1347-1354, 1991). Solche sekretorisch in Hefezellen exprimierte Fusionsproteine zeigen einen hohen Mannosylierungsgrad und eine dem in BHK-Zellen exprimierten sFv-hu $\beta$ -Gluc Fusionsprotein vergleichbare günstige Pharmakokinetik (Daten nicht gezeigt). Hierbei wird die Abwesenheit von Galaktose durch den noch höheren Mannosylierungsgrad des Fusionsproteins ausgeglichen (Tabelle 6). Das oben beschriebene sFv-hu $\beta$ -Gluc Fusionsprotein wurde, wie in Beispiel 9 näher beschrieben, gentechnisch konstruiert und in Hefe exprimiert.

Anstelle der humanen  $\beta$ -Glucuronidase kann man jedoch auch eine andere Glucuronidase mit vorteilhaften Eigenschaften einsetzen. Beispielsweise hat die *E.coli*  $\beta$ -Glucuronidase insbesondere den Vorteil, daß ihre katalytische Aktivität bei pH 7.4 signifikant höher ist als die der humanen  $\beta$ -Glucuronidase. In Beispiel 10 wurde mittels gentechnischer Methoden ein sFv-E. coli  $\beta$ -Gluc Konstrukt hergestellt und in *Saccharomyces cerevisiae* sekretorisch als funktionell aktives mannosyliertes Fusionsprotein exprimiert. Die pharmakokinetischen Daten sind denen des sFv-hu $\beta$ -Gluc Moleküls, welches in Hefe bzw. in BHK-zellen exprimiert wurde (Tabelle 4), vergleichbar.

Die Glucuronidasen aus dem Pilz *Kobayasia nipponica* und aus der Pflanze *Secale cereale* haben z.B. den Vorteil, daß sie auch als Monomere aktiv sind. In Beispiel 11 ist mittels gentechnischer Methoden ein Konstrukt hergestellt worden, welches nach Expression in *Saccharomyces cerevisiae* ein sFv-B. cereus  $\beta$ -lactamase II Fusionsprotein in vorzugsweise mannosylierter Form ausscheidet.

Dieses Fusionsprotein hat ebenfalls, wie die erfindungsgemäßen Fusionsproteine, auf  $\beta$ -Glucuronidase-Basis eine für die Prodrugaktivierung günstige Pharmakokinetik (Tabelle 4).

Ferner können die erfindungsgemäßen Verbindungen nicht nur in Kombination mit einer Prodrug, sondern auch im Rahmen der gängigen Chemotherapie eingesetzt werden, bei der als Glucuronide metabolisierte und somit inaktivierte Zytostatika durch die applizierten Verbindungen wieder in ihre toxische Form umgewandelt werden können.

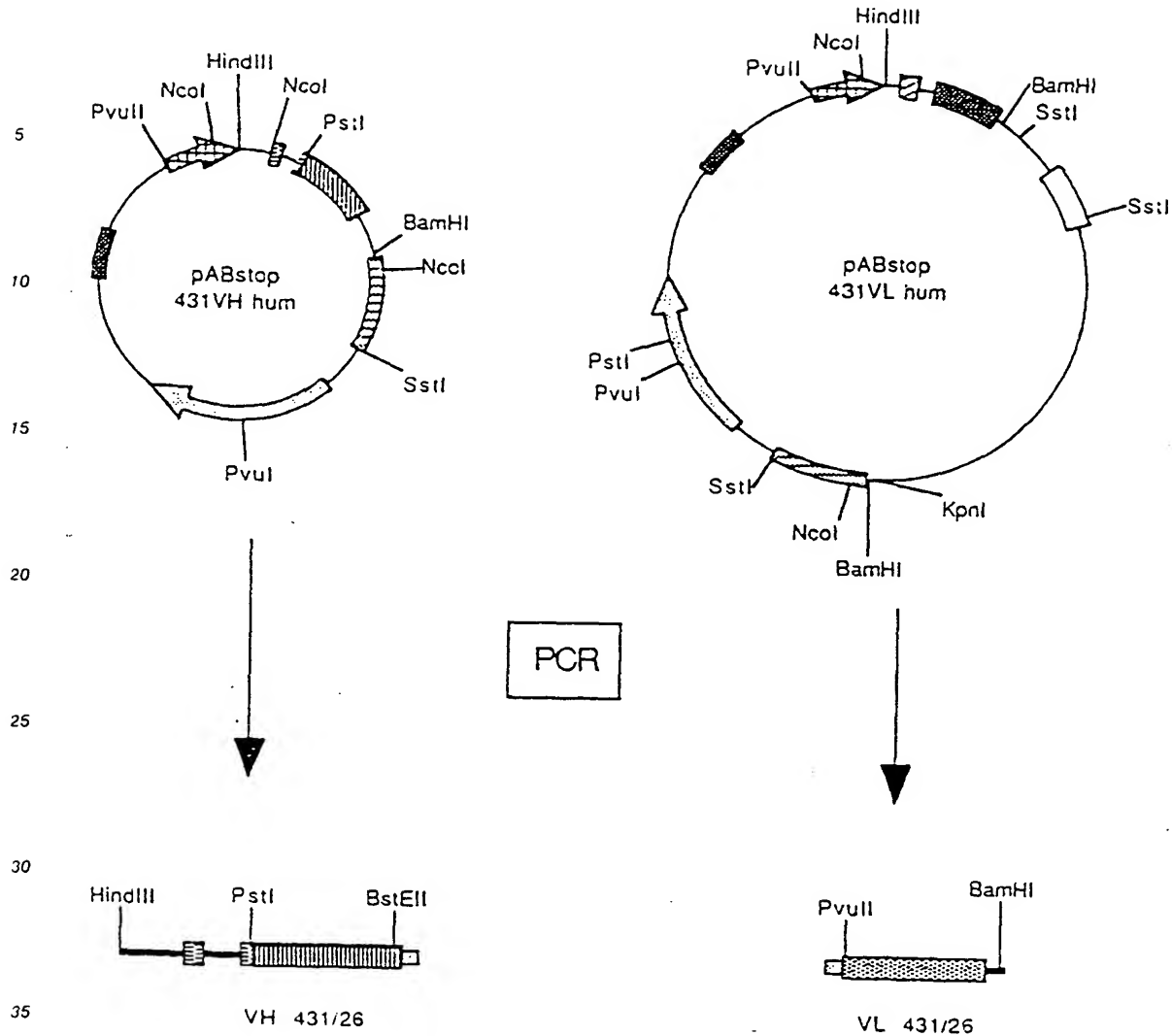
Die nachfolgenden Beispiele beschreiben nun die gentechnische Synthese von sFv-hu $\beta$ -Gluc Fusionsproteinen, sowie den Nachweis der Funktionsfähigkeit.

Ausgangsmaterial waren die Plasmide pABstop 431/26 hum V<sub>H</sub> und pABstop 431/26 hum V<sub>L</sub>. Diese Plasmide enthalten die humanisierte Version des V<sub>H</sub>- bzw. V<sub>L</sub>-Gens des anti CEA MAK BW 431/26 (Güssow und Seemann, 1991, Meth. Enzymology, 203, 99-121). Als weiteres Ausgangsmaterial diente das Plasmid pABstop 431/26 V<sub>H</sub>-hu $\beta$ -Gluc 1H (EP-A2-0 501 215), das ein V<sub>H</sub>-Exon, einschließlich der V<sub>H</sub>-eigenen Signalsequenz, gefolgt von einem CH1-Exon, dem Hinge-Exon eines humanen IgG3 C-Gens und die vollständige cDNA der humanen  $\beta$ -Glucuronidase enthält.

#### Beispiel 1:

##### Amplifikation der V<sub>H</sub> und V<sub>L</sub> Gene des MAK hum 431/26

Mit den Oligonukleotiden pAB-Back und Linker-Anti (Tab. 2) wird aus pABstop 431V<sub>H</sub> hum das V<sub>H</sub>-Gen einschließlich der V<sub>H</sub>-Gen eigenen Signalsequenz herausamplifiziert (V<sub>H</sub> 431/26) (Güssow und Seemann, 1991, Meth. Enzymology, 203, 99-121). Mit den Oligonukleotiden Linker-Sense und V<sub>L</sub>(MuH)-For (Tab. 3) wird aus pABstop 431V<sub>L</sub> hum das V<sub>L</sub>-Gen herausamplifiziert (V<sub>L</sub> 431/26).



## Beispiel 2:

### Zusammenfügen der $V_H$ 431/26 und $V_L$ 431/26 Genfragmente

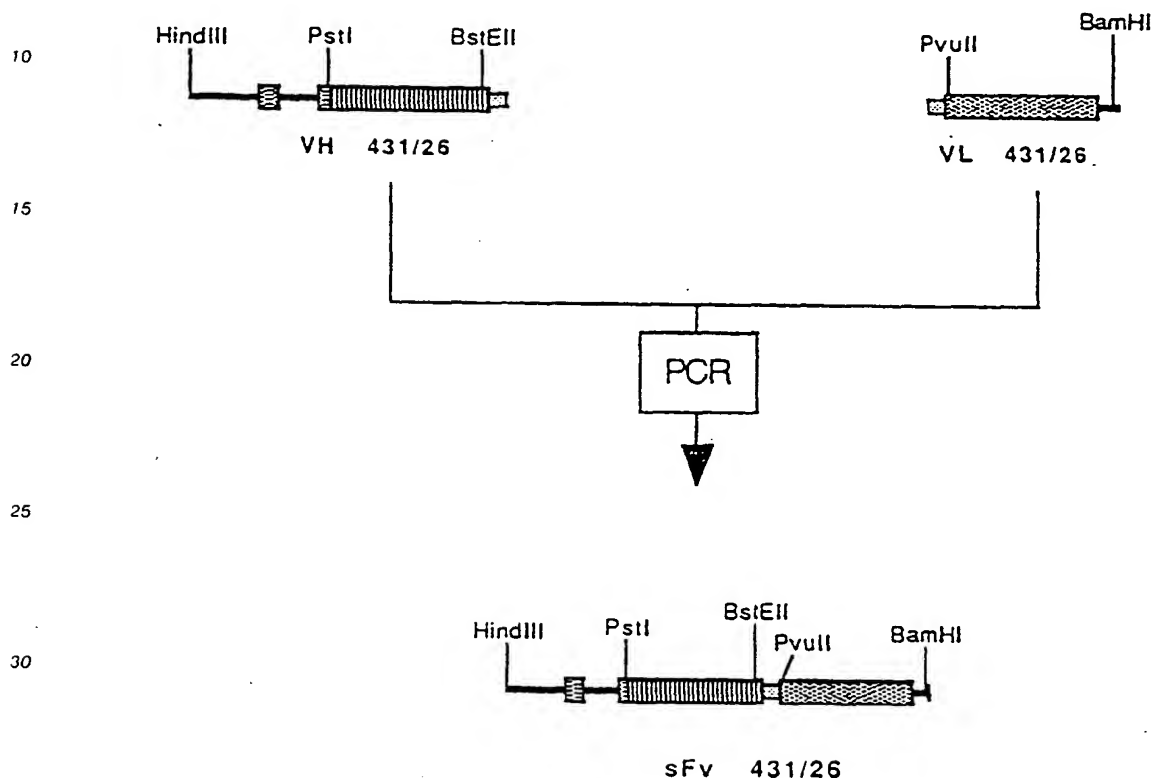
Die Oligonukleotide Linker-Anti und Linker-Sense sind partiell komplementär zueinander und codieren für einen Polypeptid-Linker, der die  $V_H$ - und  $V_L$ -Domäne zu einem sFv-Fragment verknüpfen soll. Um die amplifizierten  $V_H$ - mit den  $V_L$ -Fragmenten zu fusionieren, werden sie gereinigt und in einer 10 Zyklen Reaktion wie folgt eingesetzt:

H <sub>2</sub> O:	37.5 $\mu$ l
dNTPs (2.5 mM):	5.0 $\mu$ l
PCR-Puffer (10x): Taq-Polymerase (Perkin-Elmer Corp., Emeryville, CA)	5.0 $\mu$ l
(2.5 U/ $\mu$ l):	0.5 $\mu$ l
0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l DNA des $V_L$ -Frag.:	1.0 $\mu$ l
0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l DNA des $V_H$ -Frag.:	1.0 $\mu$ l

PCR-Puffer (10x): 100mM Tris, pH8.3, 500mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% (w/v) Gelatin.

Die Oberfläche des Reaktionsgemisches wird mit Paraffin versiegelt und anschließend die 10 Zyklen Reaktion in einer PCR-Apparatur mit dem Programm 94°C, 1 min; 55°C, 1 min; 72°C, 2 min, durchge-

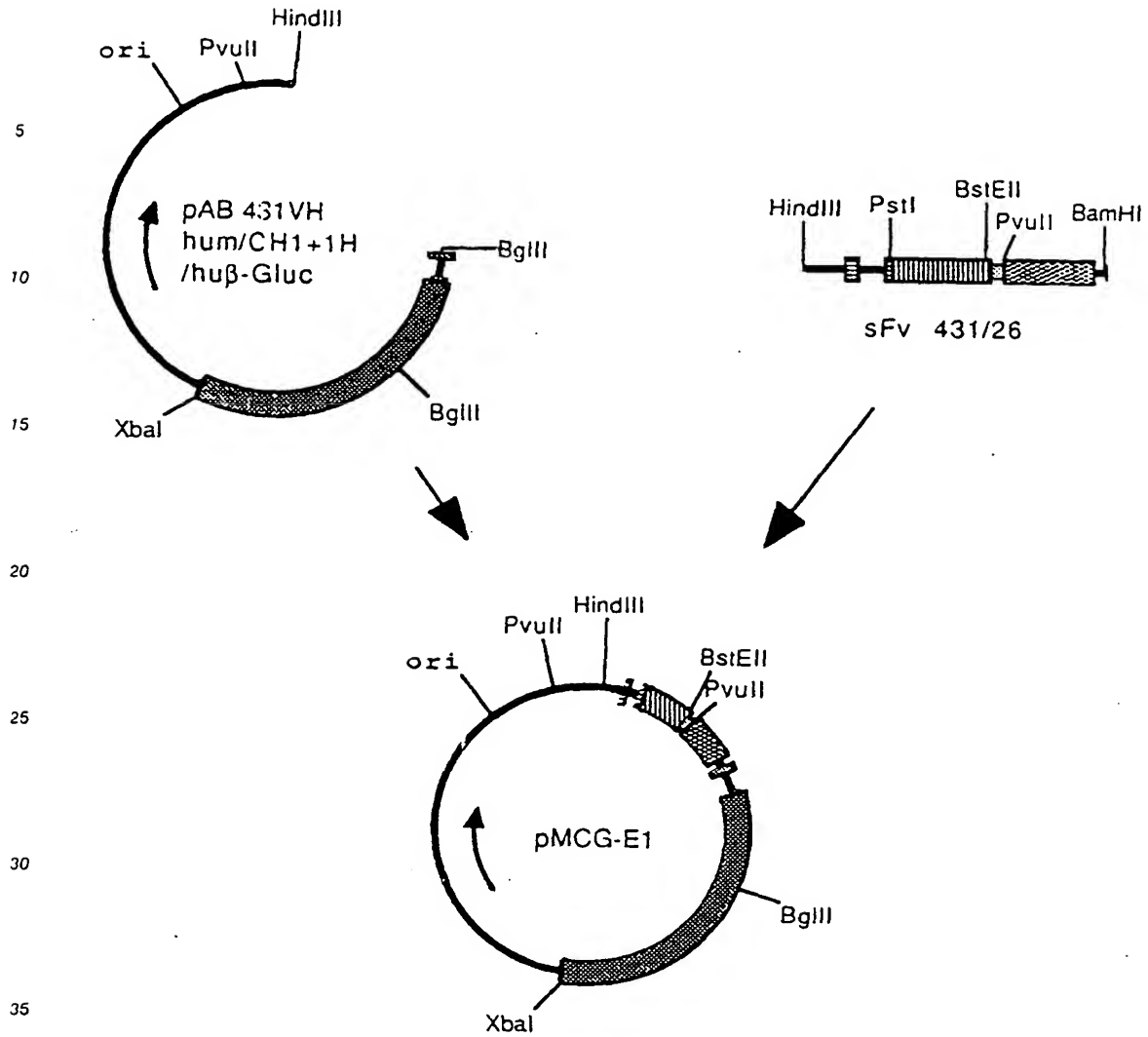
führt. Danach werden 2,5 pM der flankierenden Primer pAB-Back und  $V_{L(Mut)}$ -For zugegeben und weitere 20 Zyklen durchgeführt. Man erhält ein PCR-Fragment, das aus dem  $V_H$ -Gen besteht, welches über einen Linker mit dem  $V_L$ -Gen verbunden ist. Vor dem  $V_H$ -Gen befindet sich noch die  $V_H$ -Gen eigene Signalsequenz. Durch das Oligonukleotid  $V_{L(Mut)}$ -For wird gleichzeitig die letzte Nukleotidbase des  $V_L$ -Gens, ein C, gegen ein G ausgetauscht. Dieses PCR-Fragment codiert für einen humanisierten Single-Chain-Fv (sFv 431/26).



### Beispiel 3:

Klonierung des sFv 431/26 Fragmentes in den Expressionsvektor, der das hu $\beta$ -Glucuronidasegen enthält.

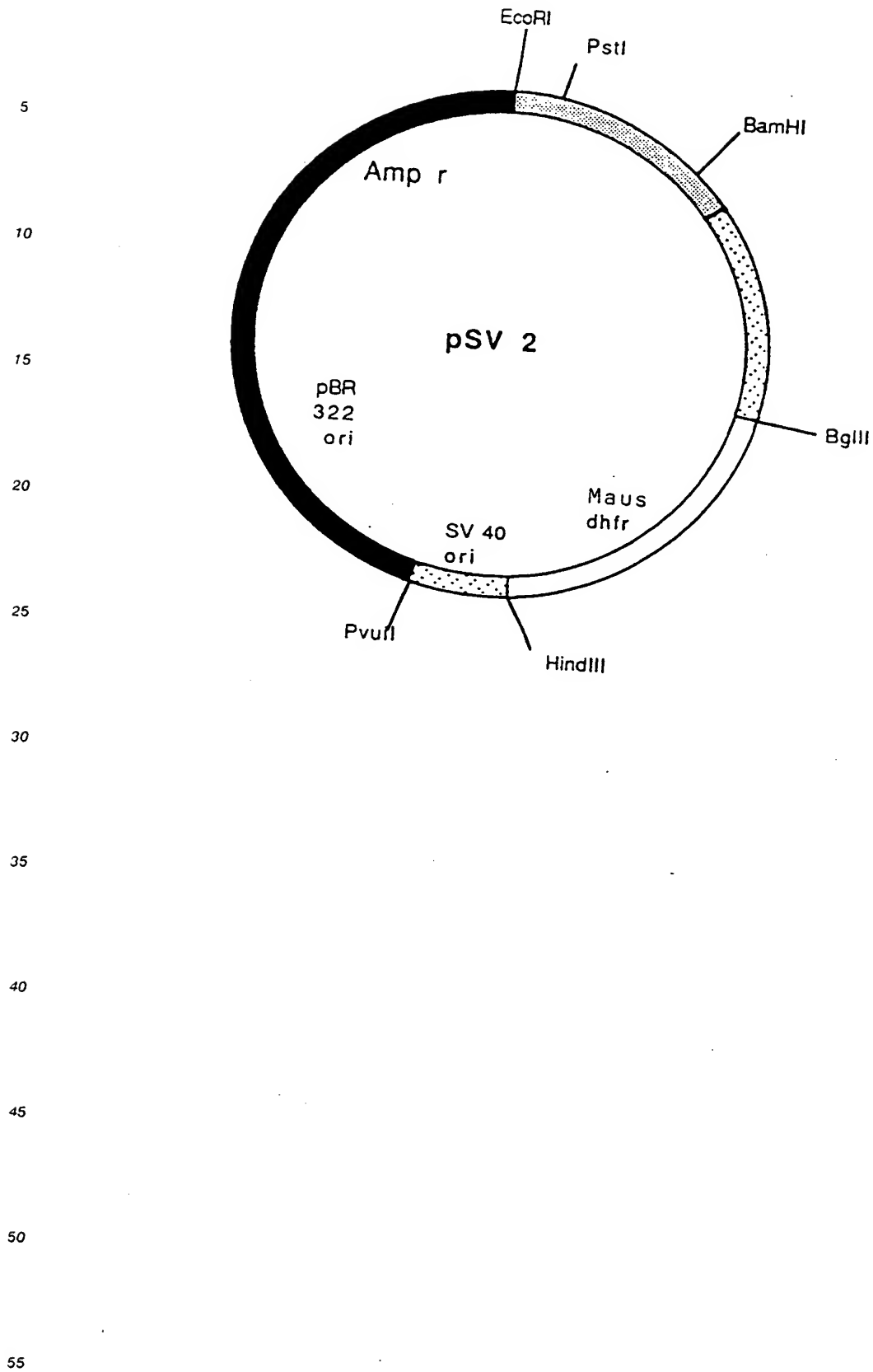
Das sFv-Fragment aus (2) wird mit HindIII und BamHI geschnitten und in den mit HindIII vollständig und mit BglII partiell gespaltenen Vektor pAB 431V<sub>H</sub> hum/CH1 + 1h/ $\beta$ Glc ligiert. Der Vektor pABstop 431/26V<sub>H</sub>hu $\beta$ Gluc1H enthält ein V<sub>H</sub>-Exon, einschließlich der V<sub>H</sub>-eigenen Signalsequenz, gefolgt von einem CH1-Exon, dem Hinge-Exon eines humanen IgG3 C-Gens und der vollständigen cDNA der humanen  $\beta$ -Glucuronidase. Es wird der Plasmidklon pMCG-E1 isoliert, der den humanisierten sFv 431/26, ein Hinge-Exon und das Gen für die humane  $\beta$ -Glucuronidase enthält (pMCG-E1).



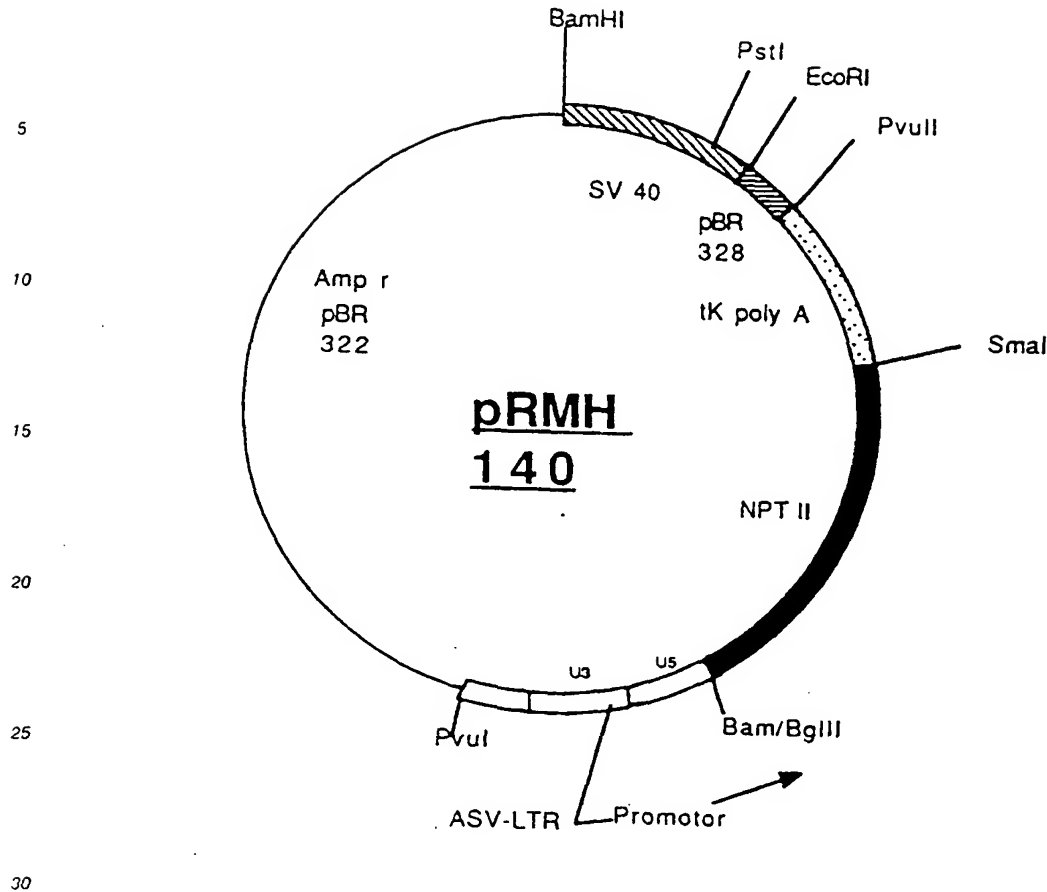
#### Beispiel 4:

#### Expression des sFv-huβ-Gluc Fusionsproteins in BHK Zellen.

Der Klon pMCG-E1 wird zusammen mit dem Plasmid pRMH 140, das ein Neomycin-Resistenzgen trägt und dem Plasmid pSV2, das ein Methotrexat-Resistenzgen trägt, in BHK Zellen transfiziert. Daraufhin wird von den BHK Zellen ein Fusionsprotein ausgeprägt, das sowohl die Antigenbindungseigenschaften des MAK BW 431/26hum als auch die enzymatische Aktivität der humanen  $\beta$ -Glucuronidase hat.





**Beispiel 5:****Nachweis der Antigenbindungseigenschaften und der enzymatischen Aktivität des sFv-hu $\beta$ -Gluc Fusionsproteins.**

Die Fähigkeit des sFv-hu $\beta$ -Gluc Fusionsproteins spezifisch an das durch den 431/26 definierte Epitop auf CEA zu binden und gleichzeitig die enzymatische Aktivität der humanen  $\beta$ -Glucuronidase auszuüben, wurde in einem Spezifitäts-Enzymaktivitätstest gezeigt (EP-A2-0501215). Der Test bestimmt die Freisetzung von 4-Methyl-umbelliferon aus 4-Methyl-umbelliferyl- $\beta$ -Glucuronid durch den  $\beta$ -Glucuronidase Anteil des Fusionsproteins, nachdem das Fusionsprotein über den sFv-Anteil an ein Antigen gebunden ist. Die ermittelten Fluoreszenzwerte werden als relative Fluoreszenzeinheiten (FE) angegeben. Der Test zeigt eine signifikante Methyl-umbelliferon Freisetzung durch das Fusionsprotein in den mit CEA beschichteten Platten. Dagegen wird durch das Fusionsprotein kein Methyl-umbelliferon in mit PEM (polymorphic epithelial mucin) beschichteten Kontrollplatten freigesetzt.

**Beispiel 6:****TSK-3000 Gelchromatographie**

Von dem über Anti-idiotyp Affinitätschromatographie gereinigten sFv-hu $\beta$ -Gluc Fusionsprotein wurden 200 ng in 25  $\mu$ l auf einer TSK Gel G 3000 SW XL Säule (TOSO HAAS Best.Nr. 3.5Wx N3211, 7.8 mm x 300 mm) in einem geeigneten Laufmittel (PBS, pH 7.2, enthaltend 5 g/l Maltose und 4.2 g/l Arginin) mit einer Flußrate von 0.5 ml/min chromatographiert. Die Merck Hitachi HPLC-Anlage (L-4000 UV-Detektor, L-6210 Intelligent Pump, D-2500 Chromato-Integrator) wurde mit  $\approx$  20 bar betrieben, die optische Dichte des Eluats wurde bei 280 nm bestimmt, und mittels eines LKB 2111 Multisac Fraktionssammlers wurden 0.5 ml Fraktionen gesammelt, die anschließend im Spezifitätsenzymaktivitätstest (SEAT) (EP 0501215 A2, Beispiel J) analysiert wurden. Das Ergebnis dieses Experimentes ist in Abb. 1 gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen,

daß die Position des durch optische Dichtemessung bei 280 nm detektierbaren Peaks mit dem Peak übereinstimmt, der die Spezifität und Enzymaktivität (SEAT) des Eluats bestimmt. Basierend auf den mittels Pfeilen angedeuteten Molekulargewichtspositionen von Standardproteinen kann gefolgert werden, daß das funktionell aktive sFv-hu $\beta$ -Gluc Fusionsprotein unter nativen Bedingungen ein ungefähres Molekulargewicht von  $\approx$  200 kDa hat.

#### Beispiel 7:

#### Aufarbeitung von Organen/Tumoren zur Fusionsproteinbestimmung

Folgende sequentielle Schritte wurden durchgeführt:

- mit Fusionsprotein bzw. Antikörperenzymkonjugat behandelte Nacktmäuse (CD1), die einen subkutanen Tumor haben, werden retroorbital entblutet und dann getötet
- das Blut wird sofort in ein Eppendorfgefäß gegeben, in dem sich schon 10  $\mu$ l Liquemin 25000 (Fa. Hoffman-LaRoche AG) befindet
- dann wird 10 min bei 2500 U/min in einer Zentrifuge (Megafuge 1.0, Fa. Heraeus) zentrifugiert
- danach wird das Plasma gewonnen und bis zur Testung eingefroren
- die Organe bzw. der Tumor werden entnommen und gewogen
- dann werden sie mit 2 ml 1 % BSA in PBS, pH 7.2, vollständig homogenisiert
- die Tumorhomogenate werden mit 0.1 N HCl auf pH 4.2 eingestellt (die Probe darf nicht übertitriert werden, da die  $\beta$ -Glucuronidase bei pH < 3.8 inaktiviert wird!)
- alle Homogenate werden 30 min bei 16000 g zentrifugiert
- der klare Überstand wird abgenommen
- die Tumorüberstände werden mit 0.1 N NaOH neutralisiert
- die Überstände und das Plasma können nun in immunologischen Tests quantifiziert werden.

#### Beispiel 8:

#### Triple-Determinanten-Test

Die Testung läuft folgendermaßen ab:

- pro Loch einer Mikrotitrationsplatte (Polystyrol U-Form, Typ B, Fa. Nunc, Best.Nr. 4-60445) werden 75  $\mu$ l eines mit 2  $\mu$ g/ml in PBS, pH 7.2, verdünnten Maus-anti-hu $\beta$ -Gluc Antikörpers (MAK 2118/157 Behringwerke) gegeben
- die Mikrotitrationsplatten werden abgedeckt und über Nacht bei R.T. inkubiert
- anschließend werden die Mikrotitrationsplatten 3x mit 250  $\mu$ l 0.05 M Tris-Citrat-Puffer, pH 7.4, pro Loch gewaschen
- diese so beschichteten Mikrotitrationsplatten werden pro Loch mit je 250  $\mu$ l Blocklösung (1 % Casein in PBS, pH 7.2) für 30' bei R.T. inkubiert (Blockierung unspezifischer Bindungsstellen) (nicht benötigte beschichtete Mikrotitrationsplatten werden 24 Stunden bei R.T. getrocknet und dann zusammen mit Trockenpatronen zur Langzeitlagerung in beschichtete Aluminiumbeutel eingeschweißt)
- während der Blockierung wird in einer unbehandelten 96 Loch U-Boden Mikrotiterplatte (Polystyrol, Fa. Renner, Best.Nr. 12058) 10 Proben + 2 Positivkontrollen + 1 Negativkontrolle in 1 % Casein in PBS, pH 7.2, 1:2 in 8 Stufen ausverdünnt (ausgehend von 150  $\mu$ l Probe werden 75  $\mu$ l Probe in 75  $\mu$ l Casein-Vorlage pipettiert usw.)
- die Blocklösung wird von der mit anti-hu $\beta$ -Gluc Antikörpern beschichteten Mikrotitrationsplatte abgesaugt, 50  $\mu$ l der verdünnten Proben werden pro Loch von der Verdünnungsplatte auf die Testplatte übertragen und 30 min bei R.T. inkubiert
- während der Probeninkubation wird das ABC-AP Reagenz (Fa. Vectastain, Best.Nr. AK-5000) angesetzt: 2 Tropfen Reagenz A (Avidin DH) in 10 ml 1 % Casein in PBS, pH 7.2, gut mischen und 2 Tropfen Reagenz B (Biotinylierte alkalische Phosphatase) zugeben, gut mischen. (Die ABC-AP Lösung muß mindestens 30' vor Gebrauch angesetzt werden.)
- die Testplatte wird 3 mal mit ELISA Waschpuffer (Behringwerke, Best.Nr. OSEW 96) gewaschen
- pro Loch werden 50  $\mu$ l Biotin markiertes Nachweisantikörpergemisch (1 + 1 Gemisch aus Maus Anti 431/26 Antikörper (MAK 2064/353, Behringwerke) und Maus anti CEA Antikörper (MAK 250/183, Behringwerke) mit einer Konzentration von je 5  $\mu$ g/ml verdünnt in 1 % Casein in PBS, pH 7.2, Endkonzentration 2.5  $\mu$ g/ml je Antikörper) gegeben
- die Testplatte wird 3 mal mit ELISA Waschpuffer gewaschen

- pro Loch werden 50  $\mu$ l der vorbereiteten ABC-AP Lösung gegeben und 30 min bei R.T. inkubiert
- während der ABC-AP Inkubation wird das Substrat angesetzt (für jeden Test frisches Substrat: 1 mM 4-Methylumbelliferyl Phosphat, Best.Nr. M-8883, Fa. Sigma, in 0.5 M Tris + 0.01 % MgCl, pH 9.6)
- die Testplatte wird 7 mal mit ELISA Waschpuffer gewaschen
- 5 - pro Loch werden 50  $\mu$ l Substrat aufgetragen, die Testplatte abgedeckt und 2 h bei 37° C inkubiert
- danach wird zu jedem Loch 150  $\mu$ l Stopplösung (0.2 M Glycin + 0.2 % SDS, pH 11.7) hinzugegeben
- die fluorometrische Auswertung erfolgt im Fluoroscan II (ICN Biomedicals, Kat.Nr. 78-611-00) bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm und einer Ausstrahlungswellenlänge von 460 nm
- 10 - anhand der Fluoreszenzwerte der im identischen Experiment mitgeführten Positivkontrolle (Verdünnungsreihe mit gereinigtem sFv-hu $\beta$ -Gluc gemischt mit CEA 5  $\mu$ g/ml als Eichkurve) wird die unbekannte Konzentration von Fusionsprotein in der Probe bestimmt.

#### Beispiel 9:

#### 15 Expression des sFv-hu $\beta$ -Glucuronidase Fusionsproteins in Hefe.

Der Single-chain-Fv (sFv) aus Beispiel 2 wird mit den Oligos 2577 und 2561 (Tabelle 7) amplifiziert und in den mit XbaI/HindIII verdauten pUC19 Vektor kloniert (Abb. 2).

Das humane  $\beta$ -Glucuronidase Gen wird mit den Oligos 2562 und 2540 (Tabelle 8) aus dem Plasmid pAB 431/26 V<sub>H</sub>hum/CH1 + 1H/hu $\beta$ -Gluc (Beispiel 3) amplifiziert und in das mit BglII/HindIII geschnittene Plasmid sFv 431/26 in pUC19 (Abb. 2) ligiert (Abb. 3).

Ein KpnI/NcoI-Fragment wird mit den Oligos 2587 und 2627 (Tabelle 9) aus dem sFv 431/26 amplifiziert und in den mit KpnI/NcoI verdauten Hefe-Expressionsvektor pIXY 120 kloniert (Abb. 4).

Das BstEII/HindIII Fragment aus dem Plasmid sFv 431/26 hu $\beta$ -Gluc in pUC19 (Abb. 3) wird in den mit BstEII/partiell HindIII verdauten Vektor pIXY 120 ligiert, der das V<sub>H</sub>-Gen, den Linker sowie einen Teil des V<sub>L</sub>-Gens trägt (V<sub>H</sub>/link/V<sub>K</sub> part. in pIXY 120) (Abb. 5).

Das entstandene Plasmid sFv 431/26 hu $\beta$ -Gluc in pIXY 120 wird in *Saccharomyces cerevisiae* transformiert und das Fusionsprotein ausgeprägt.

#### 30 Beispiel 10:

#### Expression des sFv-E.coli- $\beta$ -Glucuronidase Fusionsproteins in Hefe.

Das E.coli  $\beta$ -Glucuronidase Gen wird aus pRAJ 275 (Jefferson et al. Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 83: 8447-8451, 1986) mit den Oligos 2638 und 2639 (Tabelle 10) amplifiziert und in den mit BglII/ HindIII geschnittenen sFv 431/26 in pUC19 (Beispiel 9, Abb. 2) ligiert (Abb. 6).

Ein BstEII/HindIII Fragment aus sFv 431/26 E.coli  $\beta$ -Gluc in pUC19 wird in den mit BstEII/HindIII partiell verdauten Vektor V<sub>H</sub>/link/V<sub>K</sub>part in pIXY 120 (Beispiel 9, Abb. 4) kloniert (Abb. 7).

Das Plasmid sFv 431/26 E.coli  $\beta$ -Gluc in pIXY 120 wird in *Saccharomyces cerevisiae* transformiert und das Fusionsprotein ausgeprägt.

#### Beispiel 11:

#### Expression des sFv- $\beta$ -lactamase Fusionsproteins in Hefe.

Der Single-chain-Fv (sFv) aus Beispiel 2 wird mit den Oligos 2587 und 2669 (Tabelle 11) amplifiziert und in den mit KpnI/HindIII verdauten pUC19 Vektor ligiert (Abb. 8).

Das  $\beta$ -lactamase II Gen (Hussain et al., J. Bacteriol. 164: 223-229, 1985) wird mit den Oligos 2673 und 2674 (Tabelle 11) aus Gesamt-DNA von *Bacillus cereus* amplifiziert und in den mit EcoRI/ HindIII verdauten pUC19 Vektor ligiert (Abb. 9). Ein BclI/ HindIII Fragment des  $\beta$ -lactamase Gens wird in den mit BglII/ HindIII geschnittenen sFv 431/26 in pUC19 ligiert (Abb. 10).

Das KpnI/HindIII sFv- $\beta$ -lactamase Fragment wird in den mit KpnI/partiell HindIII verdauten pIXY 120 ligiert (Abb. 11). Das Plasmid wird in *Saccharomyces cerevisiae* transformiert und ein Fusionsprotein ausgeprägt, das sowohl die Antigenbindungseigenschaften des MAk 431/26 als auch die enzymatische Aktivität der  $\beta$ -lactamase von *Bacillus cereus* trägt.

Tabelle 1:

	CCAAGCTTAT GAATATGCAA ATCCTGCTCA TGAATATGCA AATCCTCTGA	50
5	ATCTACATGG TAAATATAGG TTTGTCTATA CCACAAACAG AAAAACATGA	100
	GATCACAGTT CTCTCTACAG TTAGTCTGAGCA CACAGGACCT CACC ATG GGA TGG Met Gly Trp	153
10	AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA GCT ACA GGTAAGGGGC Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr	199
	-10 TCACAGTAGC AGGCTTGAGG TCTGGACATA TATATGGGTG ACAATGACAT	249
15	CCACTTTGCCC TTTCTCTCCA CA GGT GTC CAC TCC CAG GTC CAA CTG CAG Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln	298
	1 GAG AGC GGT CCA GGT CTT GTG AGA CCT AGC CAG ACC CTG AGC CTG Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu	343
	10 ACC TGC ACC GTG TCT GGC TTC ACC ATC AGC AGT GGT TAT AGC TGG Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Thr Ile Ser Ser Gly Tyr Ser Trp	388
20	30 CAC TGG GTG AGA CAG CCA CCT GGA CGA GGT CTT GAG TGG ATT GGA His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly	433
	40 TAC ATA CAG TAC AGT GGT ATC ACT AAC TAC AAC CCC TCT CTC AAA Tyr Ile Gln Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys	478
25	60 AGT AGA GTG ACA ATG CTG GTA GAC ACC AGC AAG AAC CAG TTC AGC Ser Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser	523
	70 CTG AGA CTC AGC AGC GTG ACA GCC GCC GAC ACC GCG GTC TAT TAT Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr	568
30	90 TGT GCA AGA GAA GAC TAT GAT TAC CAC TGG TAC TTC GAT GTC TGG Cys Ala Arg Glu Asp Tyr Asp Tyr His Trp Tyr Phe Asp Val Trp	613
	100 GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGA GGC GGT GGA TCG Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser	658
35	120 GGC GGT GGT GGG TCG GGT GGC GGC GGA TCT GAC ATC CAG CTG ACC Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr	703
	130 CAG AGC CCA AGC AGC CTG AGC GCC AGC GTG GGT GAC AGA GTG ACC Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr	748
40	150 ATC ACC TGT AGT ACC AGC TCG AGT GTA AGT TAC ATG CAC TGG TAC Ile Thr Cys Ser Thr Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr	793
	160 CAG CAG AAG CCA GGT AAG GCT CCA AAG CTG CTG ATC TAC AGC ACA Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Thr	838
45	180	
50		
55		

Tabelle 1 (Fortsetzung):

	TCC AAC CTG GCT TCT GGT GTG CCA AGC AGA TTC AGC GGT AGC GGT	883
	Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly	
	190 200	
5	AGC GGT ACC GAC TTC ACC TTC ACC ATC AGC AGC CTC CAG CCA GAG	928
	Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu	
	210	
	GAC ATC GCC ACC TAC TAC TGC CAT CAG TGG AGT AGT TAT CCC ACG	973
	Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Thr	
	220 230	
10	TTC GGC CAA GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA GGTGAGTAGA ATTTAAACTT	1023
	Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
	240	
	TGCTTCCTCA GTTGGATCTG AGTAACTCCC AATCTTCTCT CTGCA GAG CTC AAA	1077
	Glu Leu Lys	
15	ACC CCA CTT GGT GAC ACA ACT CAC ACA TGC CCA CGG TGC CCA	1119
	Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys Pro	
	250	
	GGTAAGCCAG CCCAGGACTC GCCCTCCAGC TCAAGGCGGG ACAAGAGCCC	1169
	TAGAGTGGCC TGAGTCCAGG GACAGGCCCC AGCAGGGTGC TGACGCATCC	1219
20	ACCTCCATCC CAGATCCCCG TAACTCCCAA TCTTCTCTCT GCA GCG GCG GCG	1271
	Ala Ala Ala	
	260	
	GCG GTG CAG GGC GGG ATG CTG TAC CCC CAG GAG AGC CCG TCG CGG	1316
	Ala Val Gln Gly Gly Met Leu Tyr Pro Gln Glu Ser Pro Ser Arg	
	270	
25	GAG TGC AAG GAG CTG GAC GGC CTC TGG AGC TTC CCC GCC GAC TTC	1361
	Glu Cys Lys Glu Leu Asp Gly Leu Trp Ser Phe Arg Ala Asp Phe	
	280 290	
	TCT GAC AAC CGA CGC CGG GGC TTC GAG GAG CAG TGG TAC CGG CGG	1406
	Ser Asp Asn Arg Arg Arg Gly Phe Glu Glu Gln Trp Tyr Arg Arg	
	300	
	CCG CTG TGG GAG TCA GGC CCC ACC GTG GAC ATG CCA GTT CCC TCC	1451
	Pro Leu Trp Glu Ser Gly Pro Thr Val Asp Met Pro Val Pro Ser	
	310 320	
	AGC TTC AAT GAC ATC AGC CAG GAC TGG CGT CTG CGG CAT TTT GTC	1496
	Ser Phe Asn Asp Ile Ser Gln Asp Trp Arg Leu Arg His Phe Val	
	330	
	GGC TGG GTG TGG TAC GAA CGG GAG GTG ATC CTG CCG GAG CGA TGG	1541
	Gly Trp Val Trp Tyr Glu Arg Glu Val Ile Leu Pro Glu Arg Trp	
	340 350	
40	ACC CAG GAC CTG CGC ACA AGA GTG GTG CTG AGG ATT GGC AGT GCC	1586
	Thr Gln Asp Leu Arg Thr Arg Val Val Leu Arg Ile Gly Ser Ala	
	360	
	CAT TCC TAT GCC ATC GTG TGG GTG AAT GGG GTC GAC ACG CTA GAG	1631
	His Ser Tyr Ala Ile Val Trp Val Asn Gly Val Asp Thr Leu Glu	
	370 380	
45	CAT GAG GGG GGC TAC CTC CCC TTC GAG GCC GAC ATC AGC AAC CTG	1676
	His Glu Gly Gly Tyr Leu Pro Phe Glu Ala Asp Ile Ser Asn Leu	
	390	
	GTC CAG GTG GGG CCC CTG CCC TCC CGG CTC CGA ATC ACT ATC GCC	1721
	Val Gln Val Gly Pro Leu Pro Ser Arg Leu Arg Ile Thr Ile Ala	
	400 410	

50

55

Tabelle 1 (Fortsetzung):

5	ATC AAC AAC ACA CTC ACC CCC ACC ACC CTG CCA CCA GGG ACC ATC	1766
	Ile Asn Asn Thr Leu Thr Pro Thr Thr Leu Pro Pro Gly Thr Ile	
	420	
	CAA TAC CTG ACT GAC ACC TCC AAG TAT CCC AAG GGT TAC TTT GTC	1811
	Gln Tyr Leu Thr Asp Thr Ser Lys Tyr Pro Lys Gly Tyr Phe Val	
	430	440
10	CAG AAC ACA TAT TTT GAC TTT TTC AAC TAC GCT GGA CTG CAG CGG	1856
	Gln Asn Thr Tyr Phe Asp Phe Phe Asn Tyr Ala Gly Leu Gln Arg	
	450	
	TCT GTA CTT CTG TAC ACG ACA CCC ACC ACC TAC ATC GAT GAC ATC	1901
	Ser Val Leu Leu Thr Thr Pro Thr Thr Tyr Ile Asp Asp Ile	
	460	470
15	ACC GTC ACC ACC AGC GTG GAG CAA GAC AGT GGG CTG GTG AAT TAC	1946
	Thr Val Thr Thr Ser Val Glu Gln Asp Ser Gly Leu Val Asn Tyr	
	480	
	CAG ATC TCT GTC AAG GGC AGT AAC CTG TTC AAG TTG GAA GTG CGT	1991
	Gln Ile Ser Val Lys Gly Ser Asn Leu Phe Lys Leu Glu Val Arg	
	490	500
20	CTT TTG GAT GCA GAA AAC AAA GTC GTG GCG AAT GGG ACT GGG ACC	2036
	Leu Leu Asp Ala Glu Asn Lys Val Val Ala Asn Gly Thr Gly Thr	
	510	
	CAG GGC CAA CTT AAG GTG CCA GGT GTC AGC CTC TGG TGG CCG TAC	2081
	Gln Gly Gln Leu Lys Val Pro Gly Val Ser Leu Trp Trp Pro Tyr	
	520	530
25	CTG ATG CAC GAA CGC CCT GCC TAT CTG TAT TCA TTG GAG GTG CAG	2126
	Leu Met His Glu Arg Pro Ala Tyr Leu Tyr Ser Leu Glu Val Gln	
	540	
	CTG ACT GCA CAG ACG TCA CTG GGG CCT GTG TCT GAC TTC TAC ACA	2171
	Leu Thr Ala Gln Thr Ser Leu Gly Pro Val Ser Asp Phe Tyr Thr	
	550	560
30	CTC CCT GTG GGG ATC CGC ACT GTG GCT GTC ACC AAG AGC CAG TTC	2216
	Leu Pro Val Gly Ile Arg Thr Val Ala Val Thr Lys Ser Gln Phe	
	570	
	CTC ATC AAT GGG AAA CCT TTC TAT TTC CAC GGT GTC AAC AAG CAT	2261
	Leu Ile Asn Gly Lys Pro Phe Tyr Phe His Gly Val Asn Lys His	
	580	590
35	GAG GAT GCG GAC ATC CGA GGG AAG GGC TTC GAC TGG CCG CTG CTG	2306
	Glu Asp Ala Asp Ile Arg Gly Lys Gly Phe Asp Trp Pro Leu Leu	
	600	
	GTG AAG GAC TTC AAC CTG CTT CGC TGG CTT GGT GCC AAC GCT TTC	2351
	Val Lys Asp Phe Asn Leu Leu Arg Trp Leu Gly Ala Asn Ala Phe	
	610	620
40	CGT ACC AGC CAC TAC CCC TAT GCA GAG GAA GTG ATG CAG ATG TGT	2396
	Arg Thr Ser His Tyr Pro Tyr Ala Glu Glu Val Met Gln Met Cys	
	630	
	GAC CGC TAT GGG ATT GTG GTC ATC GAT GAG TGT CCC GGC GTG GGC	2441
	Asp Arg Tyr Gly Ile Val Val Ile Asp Glu Cys Pro Gly Val Gly	
	640	650
45	CTG GCG CTG CCG CAG TTC TTC AAC AAC GTT TCT CTG CAT CAC CAC	2486
	Leu Ala Leu Pro Gln Phe Phe Asn Asn Val Ser Leu His His His	
	660	
	ATG CAG GTG ATG GAA GAA GTG GTG CGT AGG GAC AAG AAC CAC CCC	2531
	Met Gln Val Met Glu Glu Val Val Arg Arg Asp Lys Asn His Pro	
	670	680
50		
55		

Tabelle 1 (Fortsetzung):

	GCG	GTC	GTG	ATG	TGG	TCT	GTG	GCC	AAC	GAG	CCT	GCG	TCC	CAC	CTA	2576
	Ala	Val	Val	Met	Trp	Ser	Val	Ala	Asn	Glu	Pro	Ala	Ser	His	Leu	
5	GAA	TCT	GCT	GGC	TAC	TAC	TTG	AAG	ATG	GTG	ATC	GCT	CAC	ACC	AAA	2621
	Glu	Ser	Ala	Gly	Tyr	Tyr	Leu	Lys	Met	Val	Ile	Ala	His	Thr	Lys	
				700											710	
	TCC	TTG	GAC	CCC	TCC	CGG	CCT	GTG	ACC	TTT	GTG	AGC	AAC	TCT	AAC	2666
	Ser	Leu	Asp	Pro	Ser	Arg	Pro	Val	Thr	Phe	Val	Ser	Asn	Ser	Asn	
10	TAT	GCA	GCA	GAC	AAG	GGG	GCT	CCG	TAT	GTG	GAT	GTG	ATC	TGT	TTG	2711
	Tyr	Ala	Ala	Asp	Lys	Gly	Ala	Pro	Tyr	Val	Asp	Val	Ile	Cys	Leu	
				730											740	
	AAC	AGC	TAC	TAC	TCT	TGG	TAT	CAC	GAC	TAC	GGG	CAC	CTG	GAG	TTG	2756
	Asn	Ser	Tyr	Tyr	Ser	Trp	Tyr	His	Asp	Tyr	Gly	His	Leu	Glu	Leu	
15										750						
	ATT	CAG	CTG	CAG	CTG	GCC	ACC	CAG	TTT	GAG	AAC	TGG	TAT	AAG	AAG	2801
	Ile	Gln	Leu	Gln	Leu	Ala	Thr	Gln	Phe	Glu	Asn	Trp	Tyr	Lys	Lys	
				760											770	
	TAT	CAG	AAG	CCC	ATT	ATT	CAG	AGC	GAG	TAT	GGA	GCA	GAA	ACG	ATT	2846
20	Tyr	Gln	Lys	Pro	Ile	Ile	Gln	Ser	Glu	Tyr	Gly	Ala	Glu	Thr	Ile	
										780						
	GCA	GGG	TTT	CAC	CAG	GAT	CCA	CCT	CTG	ATG	TTC	ACT	GAA	GAG	TAC	2891
	Ala	Gly	Phe	His	Gln	Asp	Pro	Pro	Leu	Met	Phe	Thr	Glu	Glu	Tyr	
				790											800	
	CAG	AAA	AGT	CTG	CTA	GAG	CAG	TAC	CAT	CTG	GGT	CTG	GAT	CAA	AAA	2936
25	Gln	Lys	Ser	Leu	Leu	Glu	Gln	Tyr	His	Leu	Gly	Leu	Asp	Gln	Lys	
										810						
	CGC	AGA	AAA	TAT	GTG	GTT	GGA	GAG	CTC	ATT	TGG	AAT	TTT	GCC	GAT	2981
	Arg	Arg	Lys	Tyr	Val	Val	Gly	Glu	Leu	Ile	Trp	Asn	Phe	Ala	Asp	
				820											830	
	TTC	ATG	ACT	GAA	CAG	TCA	CCG	ACG	AGA	GTG	CTG	GGG	ATT	AAA	AAG	3026
30	Phe	Met	Thr	Glu	Gln	Ser	Pro	Thr	Arg	Val	Leu	Gly	Asn	Lys	Lys	
										840						
	GGG	ATC	TTC	ACT	CGG	CAG	AGA	CAA	CCA	AAA	AGT	GCA	GCG	TTC	CTT	3071
	Gly	Ile	Phe	Thr	Arg	Gln	Arg	Gln	Pro	Lys	Ser	Ala	Ala	Phe	Leu	
				850											860	
	TTG	CGA	GAG	AGA	TAC	TGG	AAG	ATT	GCC	AAT	GAA	ACC	AGG	TAT	CCC	3116
35	Leu	Arg	Glu	Arg	Tyr	Trp	Lys	Ile	Ala	Asn	Glu	Thr	Arg	Tyr	Pro	
										870						
	CAC	TCA	GTA	GCC	AAG	TCA	CAA	TGT	TTG	GAA	AAC	AGC	CCG	TTT	ACT	3161
	His	Ser	Val	Ala	Lys	Ser	Gln	Cys	Leu	Glu	Asn	Ser	Pro	Phe	Thr	
				880											890	
40	TGA	GCAAGACTGA	TACCACCTGC	GTGTCCCTTC	CTCCCCGAGT	CAGGGCGACT										3214
	...															
	TCCACAGCAG	CAGAACAAGT	GCCTCCTGGA	CTGTTACCGG	CAGACCAGAA											3264
	CGTTTCTGGC	CTGGGTTTTG	TGGTCATCTA	TTCTAGCAGG	GAACACTAAA											3314
45																
50																
55																

## 5

## 10

15

## 20

25

## 30

## 35

40

## 45

50



Tabelle 4

Pharmakokinetik des sFv-hu $\beta$ Gluc Fusionsproteins in MzSto1 tragenden CD1 nu/nu Mäusen									
ng sFv-hu $\beta$ Gluc pro Gramm Gewebe bzw ml Plasma gemessen im Tripledeterminantenlest									
Gewebetyp	Maus								
	0,05Std	3Std	24Std	48Std	120Std	120Std	120Std	120Std	120Std
Tumor	24,8	4	7,7	2,1	2,2	6,2			
Milz	15,4	4,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1			
Leber	40,9	10,1	0,8	0,8	0,3	<0,1			
Darm	5,2	4,4	1,1	1,2	0,6	<0,1			
Niere	44,4	7	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1			
Lunge	154,8	17,3	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1			
Herz	148,3	8,2	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1			
Plasma	630,9	95	2,7	0,4	<0,1	<0,1			
i.v. Injektion von 0,8 $\mu$ g gereinigtem Fusionsprotein pro Maus									

Tabelle 5

Monosaccharid-Komponentenanalytik des Kohlehydratanteils des sFv-huβ-Gluc Fusionsproteins aus BHK-Zellen

Das gereinigte sFv-huβ-Gluc Fusionsprotein wurde auf seinen Kohlehydratanteil hin untersucht. Dabei wurden nach Hydrolyse folgende Einzelkomponenten im angegebenen Molverhältnis gefunden (mol Kohlenhydrat/mol sFv-huβ-Gluc).

	Fukose	Galaktosamin	N-Acetylglukosamin	Galaktose	Glukose	Mannose	N-Acetylneuraminsäure
sFv-huβ-Gluc	4	2	30	8	1	43	4

Aus den Molverhältnissen von Mannose, Glukosamin und Galaktose kann auf das Vorliegen von "High-Mannose Type"- und/oder "Hybrid Type"-Strukturen (neben "Complex Type"-Strukturen) geschlossen werden. Endständig treten deshalb Mannose, Galaktose, - Acetylneuraminsäure und evtl. N-Acetylglukosamin auf, wobei Mannose auch als Mannose-6-phosphat vorliegen kann.

Methoden:

Die Neuraminsäurebestimmung erfolgte nach Hermentin und Seidat (1991) GBF Monographs Volume 15, S. 185 - 188 (nach 30 min. Hydrolyse in Gegenwart von 0.1 N Schwefelsäure bei 80°C und nachfolgender Neutralisation mit 0.4 N Natrionlauge) mittels "high-pH anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection" (HPAE-PAD). Die Bestimmung der Monosaccharid-Komponenten erfolgte (nach 4 h Hydrolyse in Gegenwart von 2 N Trifluoressigsäure bei 100°C und Einengung zur Trockne in einer SpeedVac) ebenfalls mittels HPAE-PAD in Anlehnung an das von Hardy et al. (1988) Analytical Biochemistry 170, 54 - 62 beschriebene Verfahren.

Tabelle 6

Monosaccharid-Komponentenanalytik des Kohlenhydratannteiles des sFv-huBGluc Fusionsproteins aus *Saccharomyces cerevisiae*.

sFv-huBGluc (mol/mol)	Glukosamin	Glucose	Mannose	mol/mol
	6	12	150	

Tabelle 7:

Oligos für sFv 431/26 Klonierung in pUC 19

**sFv for (2561)**

5' TTT TTA AGC TTA GAT CTC CAC CTT GGT C 3'

**sFv back (2577)**

5' AAA AAT CTA GAA TGC AGG TCC AAC TGC AGG  
AGA G 3'

Tabelle 8:

Oligos für hum.β-Gluc Klonierung in sFv pUC 19

**Hum.β-Gluc. back Oligo (2562)**

5' AAA AAA GTG ATC AAA GCG TCT GGC GGG CCA CAG  
GGC GGC ATC CTG TAC 3'

**Hum.β-Gluc for Oligo (2540)**

5' TTT TAA GCT TCA AGT AAA CGG GCT GTT 3'

Tabelle 9:

5 Oligos für sFv/hum- $\beta$ -Gluc Klonierung in pIXY120

PCR Oligo VHpIXY back (2587)

10

5' TTT TGG TAC CTT TGG ATA AAA GAC AGG TCC AAC TGC AGG AGA G 3'

15

PCR Oligo VKpIXY for (2627)

20

5' A AAA CCA TGG GAA TTC AAG CTT CGA GCT GGT ACT ACA GGT 3'

25

Tabelle 10:

30 Oligos für E.coli- $\beta$ -Gluc Klonierung in sFv pUC 19

E. coli- $\beta$ -Gluc. for (2639)

35

5' TTT TAA GCT TCC ATG GCG GCC GCT CAT TGT TTG  
CCT CCC TGC TG 3'

40

E. coli- $\beta$ -Gluc. back (2638)

45

5' AAA AAG ATC TCC GCG TCT GGC GGG CCA CAG TTA  
CGT GTA GAA ACC CCA 3'

50

55

Tabelle 11:Oligos für sFv/ $\beta$ -lactamase Klonierung in pIXY120**PCR Oligo VHpIXY back (2587)**

5' TTT TGG TAC CTT TGG ATA AAA GAC AGG TCC AAC TGC AGG AGA G 3'

**PCR Oligo VKpIXY/ $\beta$ -lactamase for (2669)**

5' AAA AAG CTT AGA TCT CCA GCT TGG TCC C 3'

**PCR Oligo link/ $\beta$ -lactamase back (2673)**

5' AAA GAA TTC TGA TCA AAT CCT CGA GCT CAG GTT CAC  
 AAA AGG TAG AGA AAA CAG T 3' Linker

**PCR Oligo  $\beta$ -lactamase for (2674)**

5' TTT AAG CTT ATT TTA ATA AAT CCA ATG T 3'

**Patentansprüche**

1. Verbindung, enthaltend eine Antigenbinderegion, welche an mindestens ein prodrug-aktivierendes Enzym gebunden ist, dadurch gekennzeichnet, daß die Antigenbinderegion aus einer einzigen Polypeptidkette besteht.
2. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung kovalent gebundene Kohlenhydrate trägt.
3. Verbindung nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Antigenbinderegion eine variable Domäne einer schweren Antikörperkette und eine variable Domäne einer leichten Antikörperkette enthält (sFv-Fragment).
4. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Antigenbinderegion an ein tumorassoziiertes Antigen (TAA) bindet.
5. Verbindung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das TAA ein N-CAM, PEM, EGF-R, Sialyl-Le<sup>x</sup>, Sialyl-Le<sup>x</sup>, TF $\beta$ , GICA, GD<sub>3</sub>, GD<sub>2</sub>, TAG72, CA125, das durch den MAK L6 definierte 24-25 kDa Glycoprotein oder CEA, vorzugsweise ein CEA ist.

6. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym eine Lactamase, vorzugsweise eine *Bacillus cereus* II  $\beta$ -lactamase, Pyroglutamat-Aminopeptidase, D-Amino-peptidase, Oxidase, Peroxidase, Phosphatase, Hydroxynitrilase, Protease, Esterase, Carboxypeptidase, vorzugsweise eine Carboxypeptidase G2 aus *Pseudomonas* oder Glycosidase ist.
- 5 7. Verbindung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym eine  $\beta$ -Glucuronidase, vorzugsweise eine *E.coli*, *Kobayasia nipponica*, *Secale cereale* oder humane  $\beta$ -Glucuronidase ist.
8. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Antigenbinderegion  
10 über einen Peptidlinker mit dem Enzym verbunden ist.
9. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Glycosylierung entweder mittels chemischer Methoden oder durch Auswahl geeigneter Expressionssysteme erfolgt.
- 15 10. Verbindung nach Anspruch 1-9, dadurch gekennzeichnet, daß sie sekretorisch in *Saccharomyces cerevisiae* bzw. vorteilhafter in *Hansenula polymorpha* exprimiert wird.
11. Verbindung nach Anspruch 1-9, dadurch gekennzeichnet, daß sie in *E. coli* exprimiert wird und anschließend chemisch glycosyliert, vorzugsweise galaktosyliert und/oder mannosyliert wird.
- 20 12. Verbindung nach Anspruch 1-9, dadurch gekennzeichnet, daß das sFv  $\beta$ -lactamase Fusionsprotein, welches periplasmatisch in *E. coli* exprimiert wurde, chemisch glycosyliert, vorzugsweise galaktosyliert und/oder mannosyliert ist.
- 25 13. Verbindung nach Anspruch 1-9, dadurch gekennzeichnet, daß das sFv  $\beta$ -lactamase Fusionsprotein sekretorisch in *Saccharomyces cerevisiae* bzw. *Hansenula polymorpha* exprimiert ist.
14. Nukleinsäure, kodierend für eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 8.
- 30 15. Nukleinsäure nach Anspruch 14, kodierend für ein humanisiertes sFv-Fragment gegen CEA und eine humane  $\beta$ -Glucuronidase.
16. Nukleinsäure nach Anspruch 14 mit der Sequenz gemäß Tab. 1.
- 35 17. Vektor, enthaltend eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 14 bis 16.
18. Wirtszelle, enthaltend eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 14 bis 16 oder einen Vektor nach Anspruch 17.
- 40 19. Wirtszelle nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine BHK-, CHO-, COS-, HeLa-, Insekten-, Tabakpflanzen-, Hefe- oder *E.coli*-Zelle ist.
20. Transgene Säugetiere mit Ausnahme von Mensch, enthaltend eine DNA nach einem der Ansprüche 14 bis 16 oder einen Vektor nach Anspruch 17.
- 45 21. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung nach Anspruch 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß
  - a) eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 14 bis 16 oder ein Vektor nach Anspruch 17 in eine Wirtszelle eingebracht wird,
  - b) die Wirtszelle kultiviert und
  - 50 c) die Verbindung isoliert wird.
22. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung nach Anspruch 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß
  - a) eine Wirtszelle nach Anspruch 18 oder 19 kultiviert und
  - 55 b) die Verbindung isoliert wird.
23. Verwendung der Verbindung nach Anspruch 1 bis 13 zur Herstellung eines Arzneimittels oder eines Diagnostikums.

24. Verwendung der Verbindung nach Anspruch 1 bis 13 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Krebs.

25. Arzneimittel, enthaltend eine Verbindung nach Anspruch 1 bis 13.

5

26. Diagnostikum, enthaltend eine Verbindung nach Anspruch 1 bis 13.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55



TSK 3000 Gelchromatographie

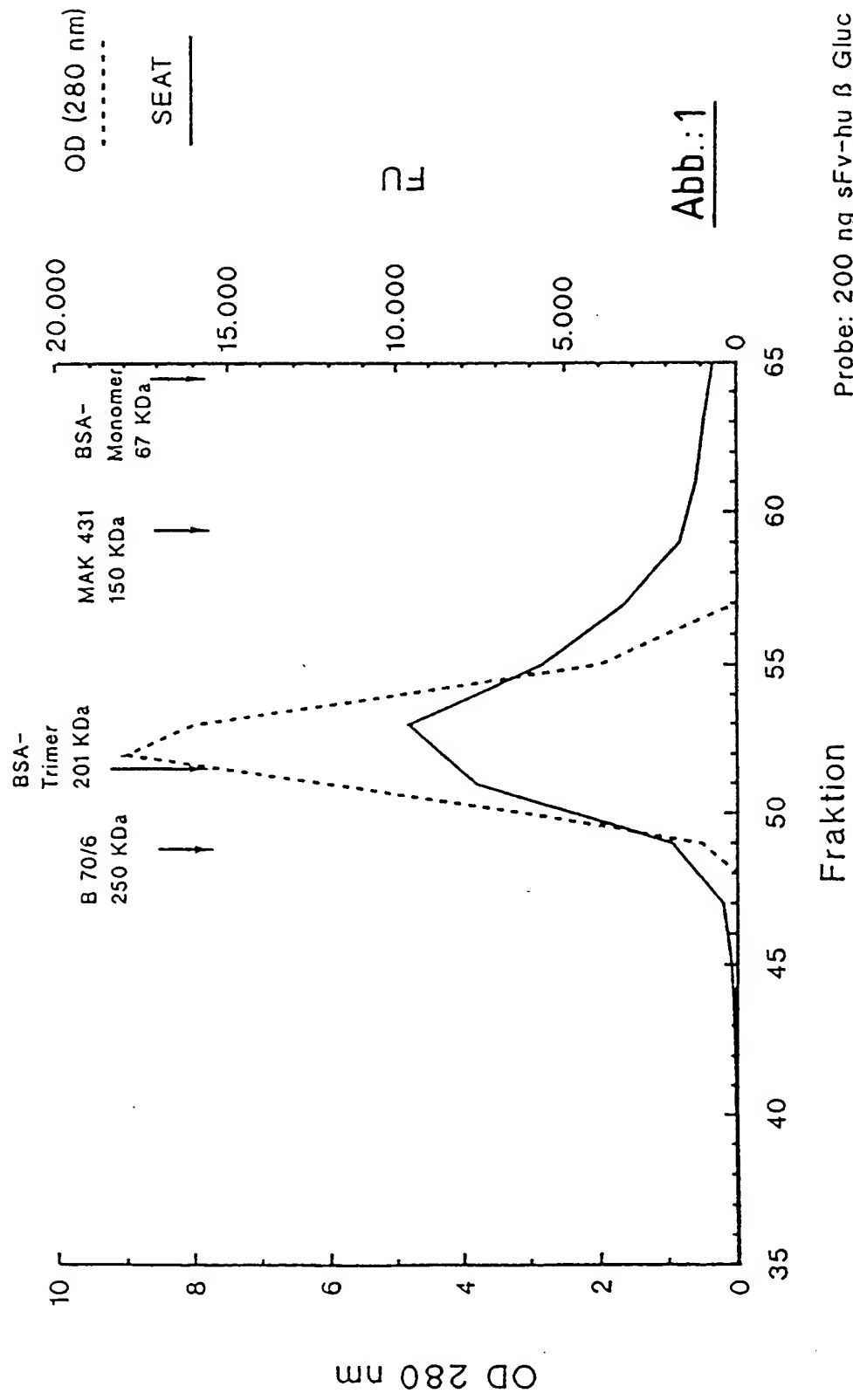


Abb.:1

Probe: 200 ng sFv-hu  $\beta$  Gluc  
Fusionsprotein in 25  $\mu$ l



Abb.: 2

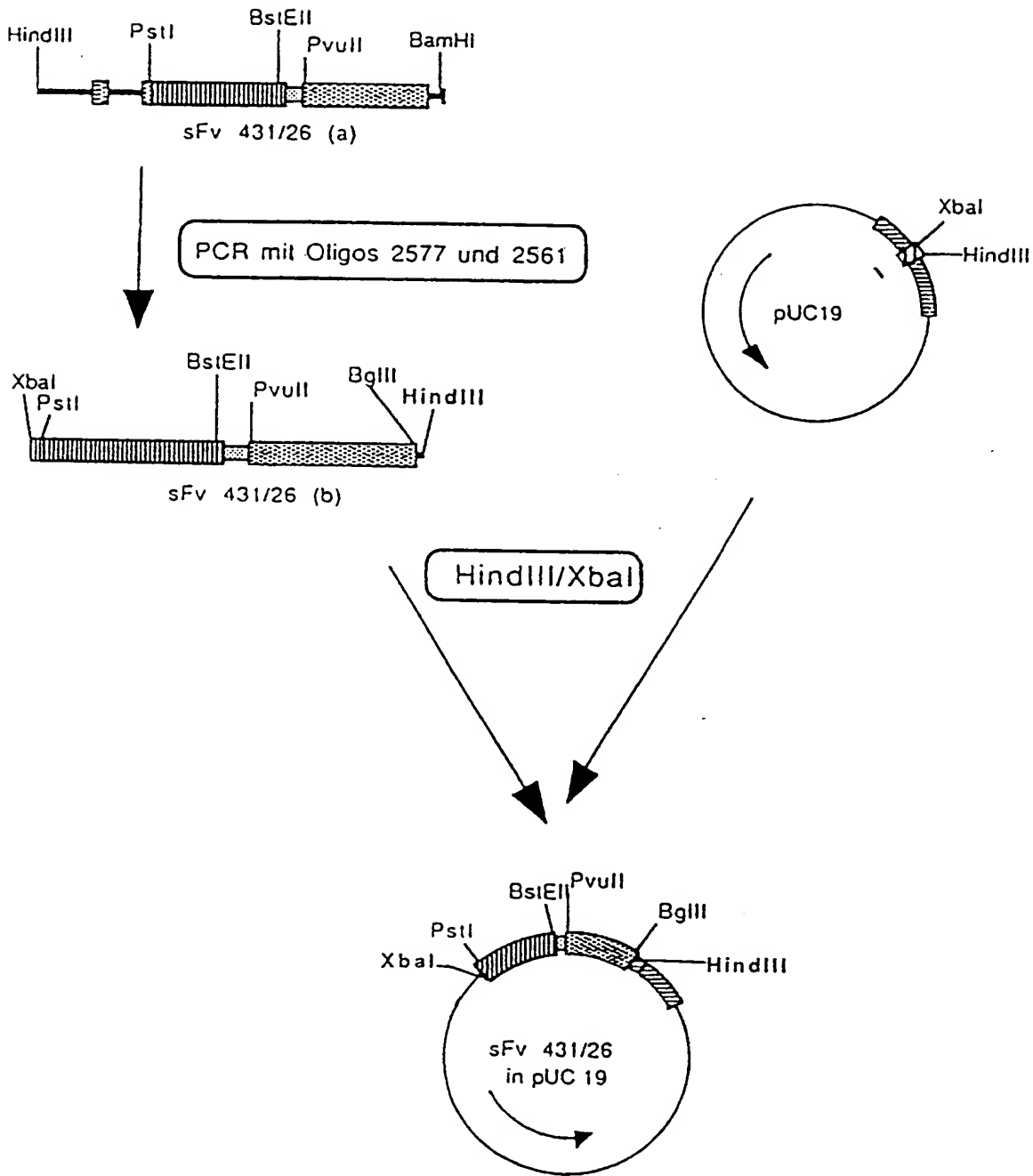




Abb.: 3

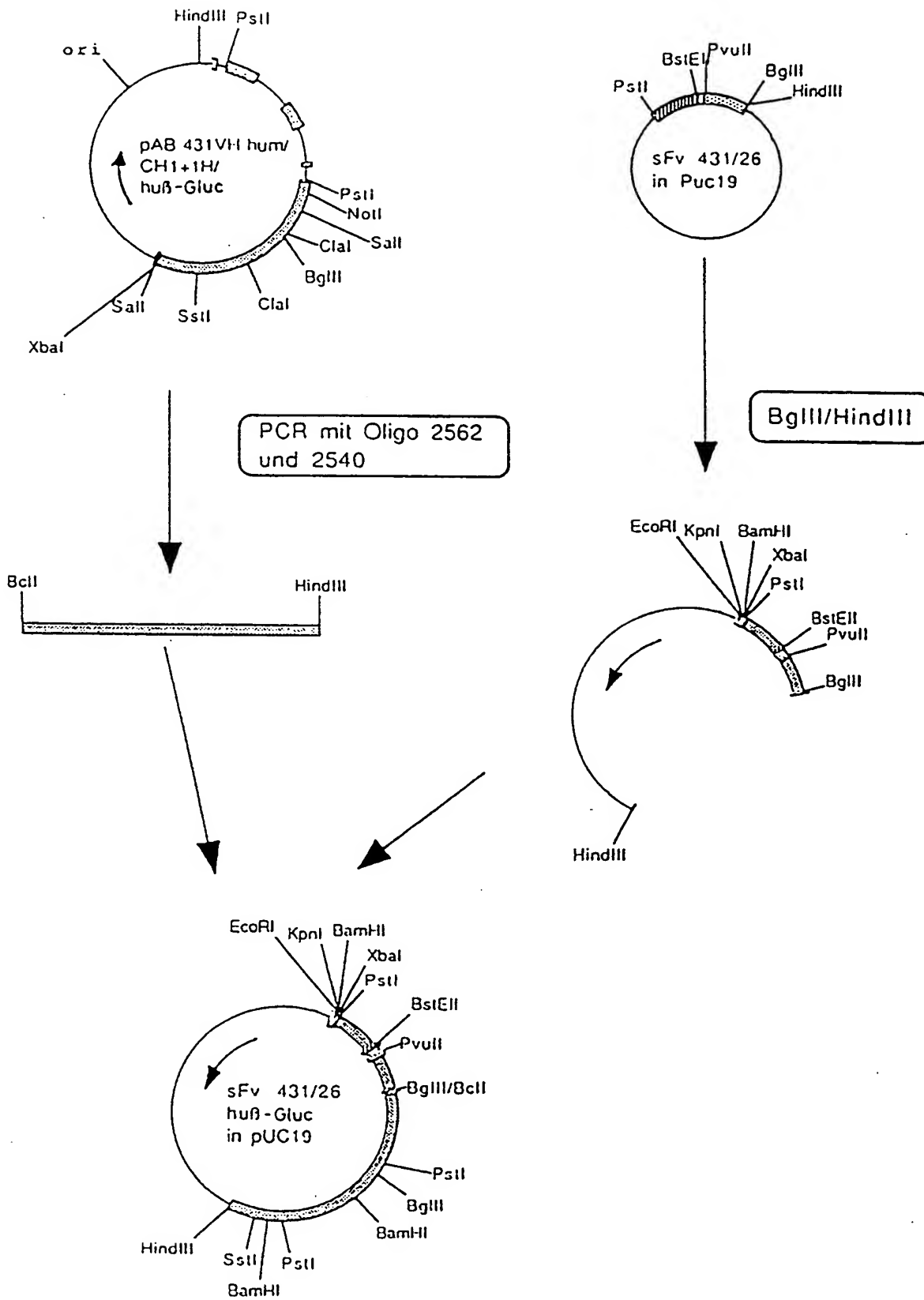




Abb.: 4

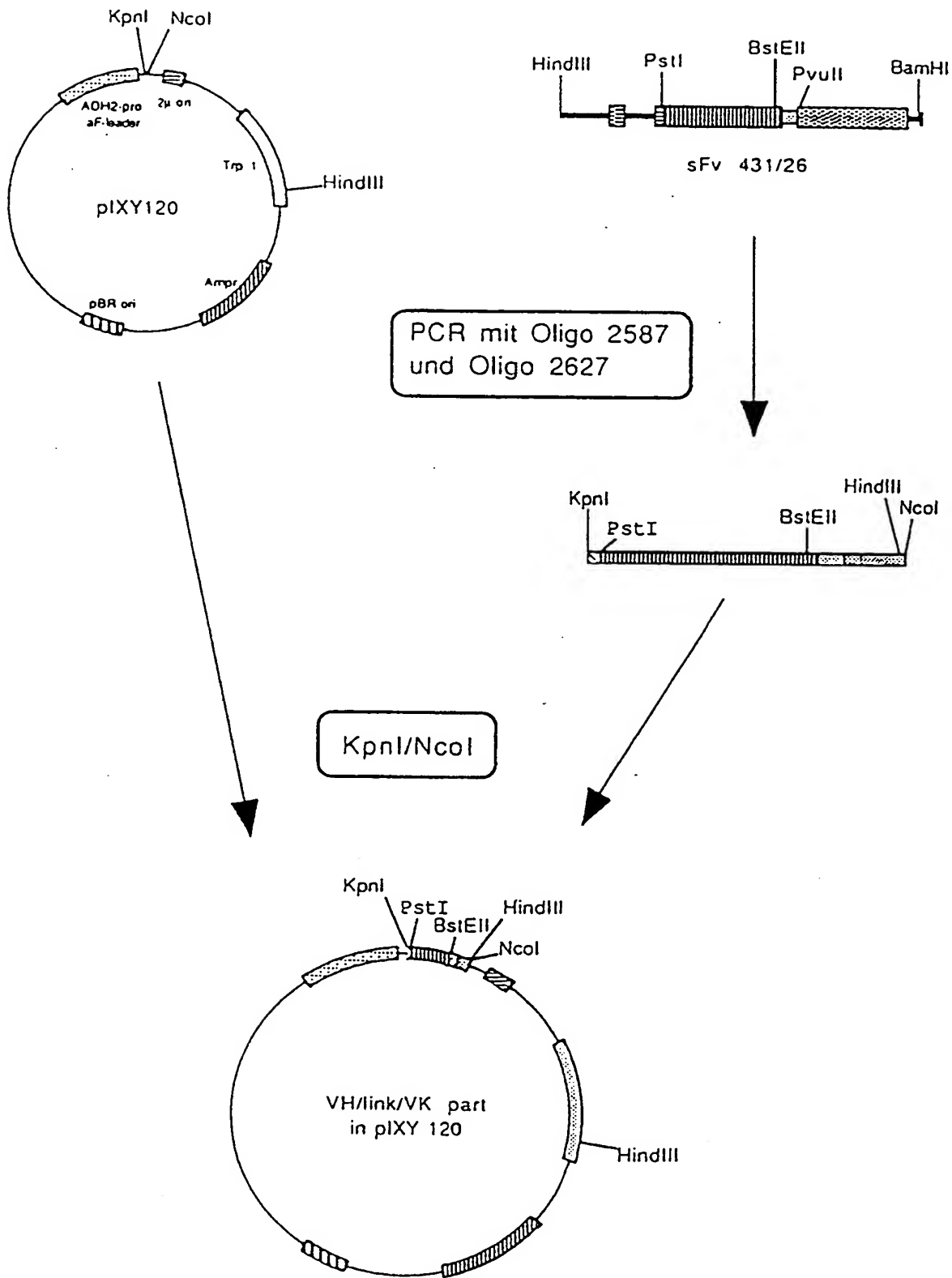






Abb.: 5

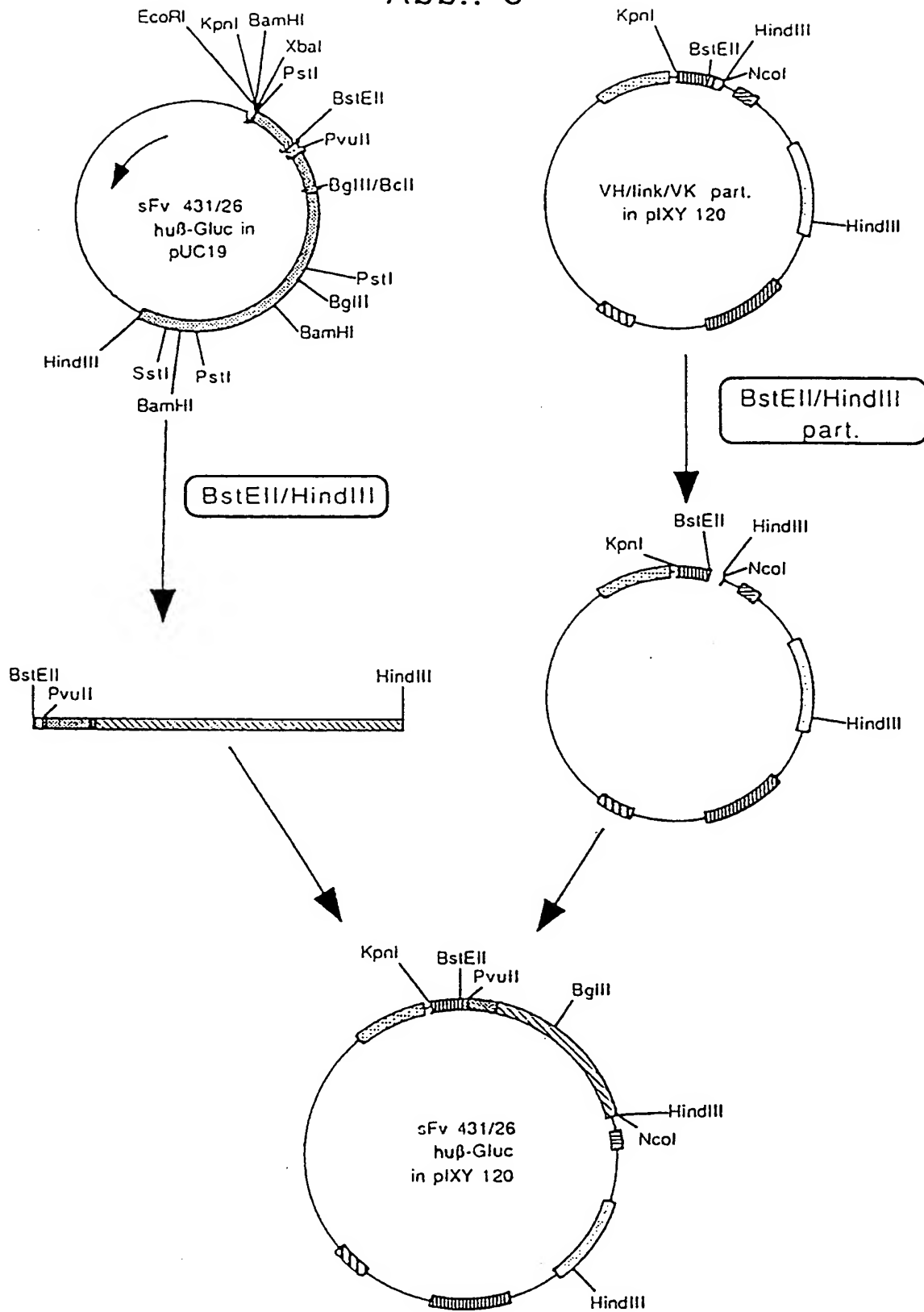




Abb.: 6

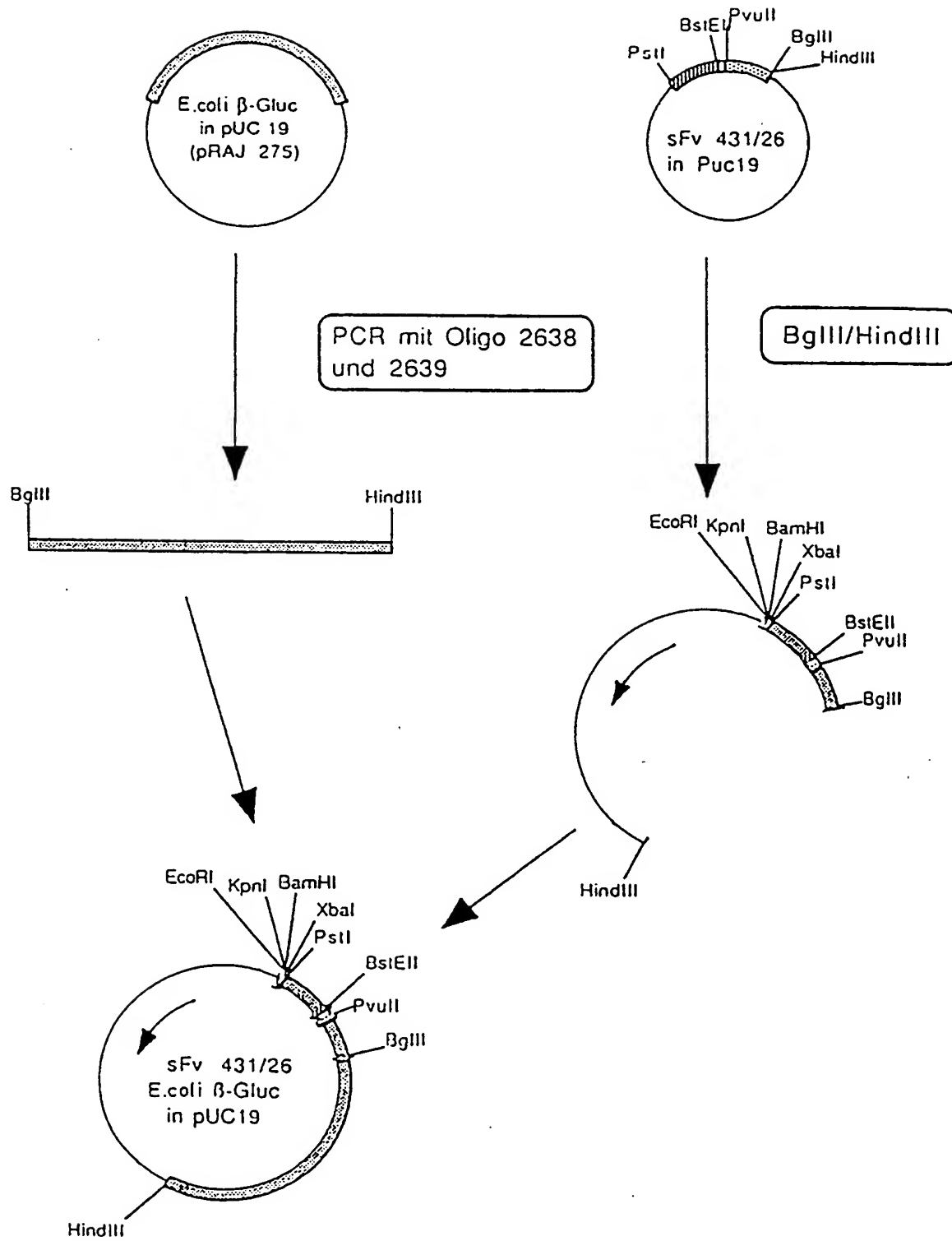




Abb.: 7

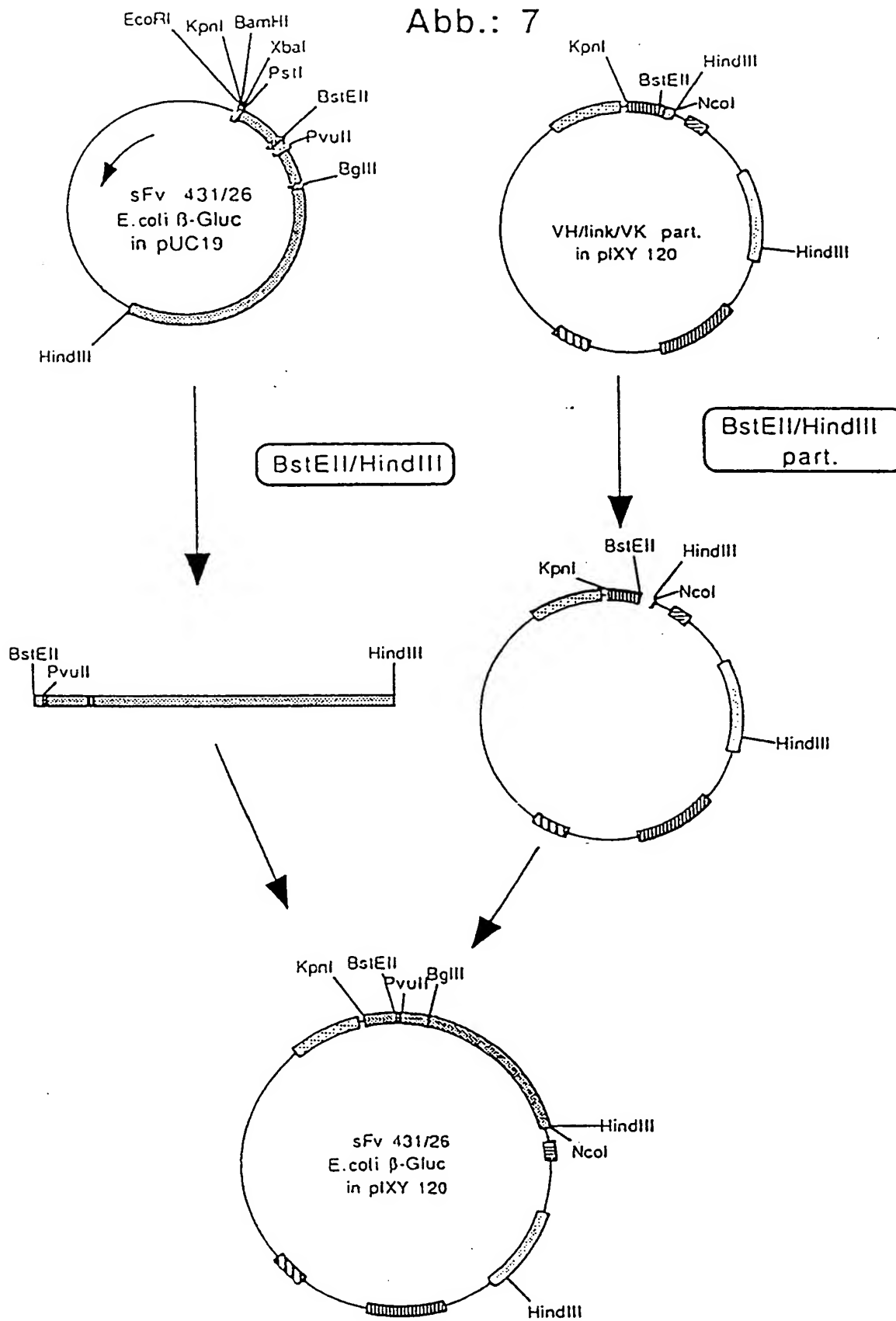




Abb.: 8

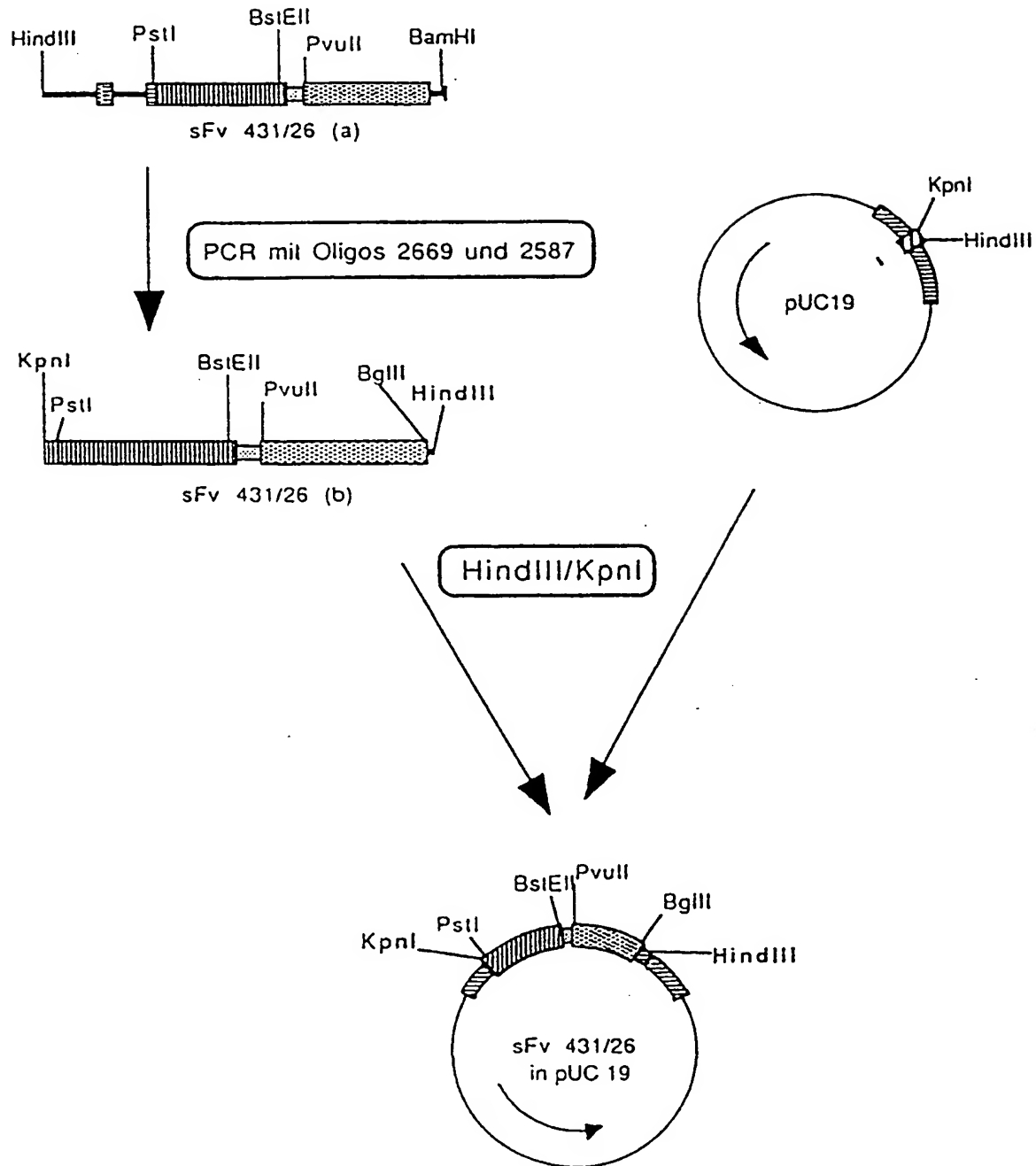
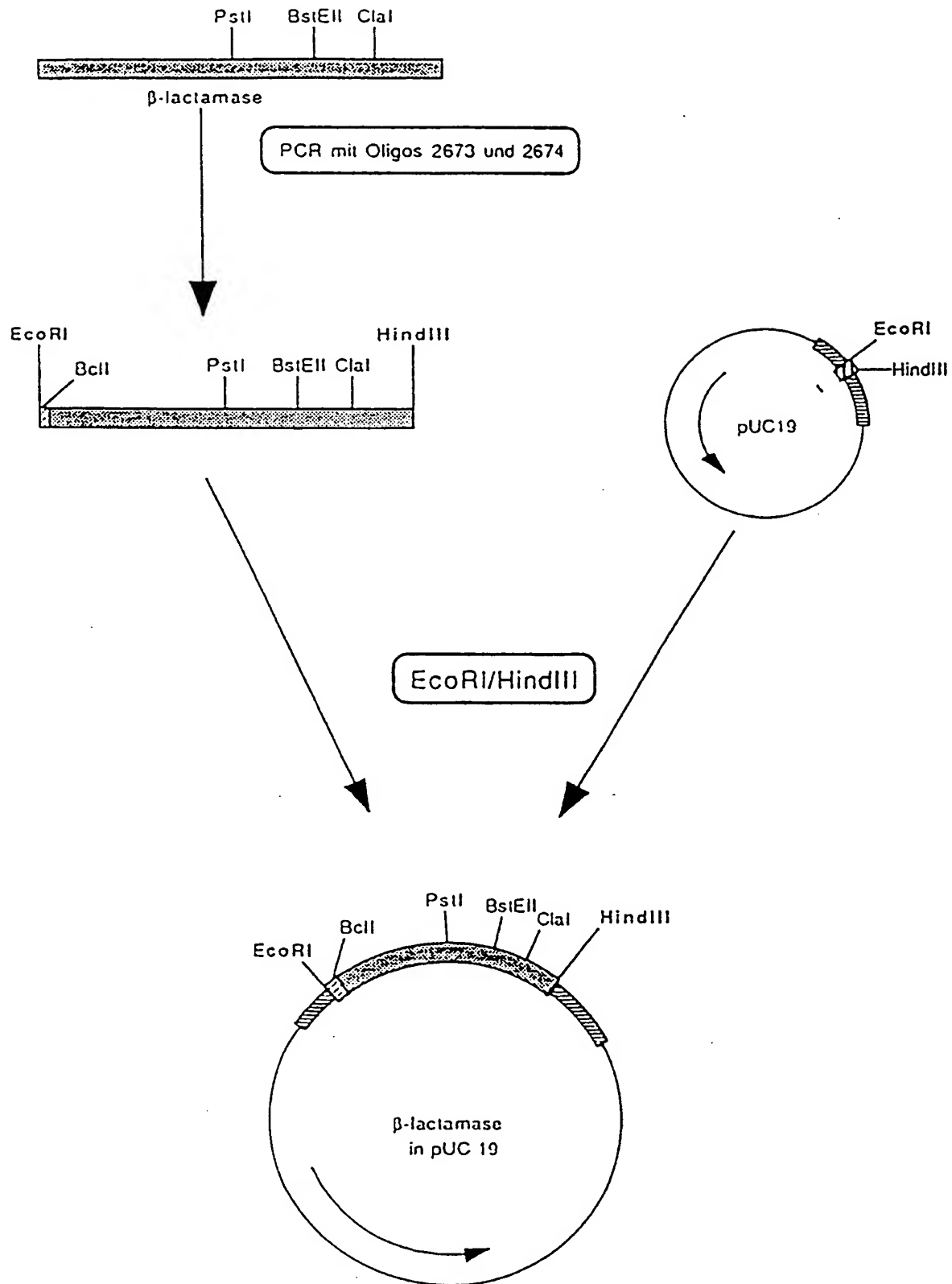






Abb.: 9





## Abb.: 10

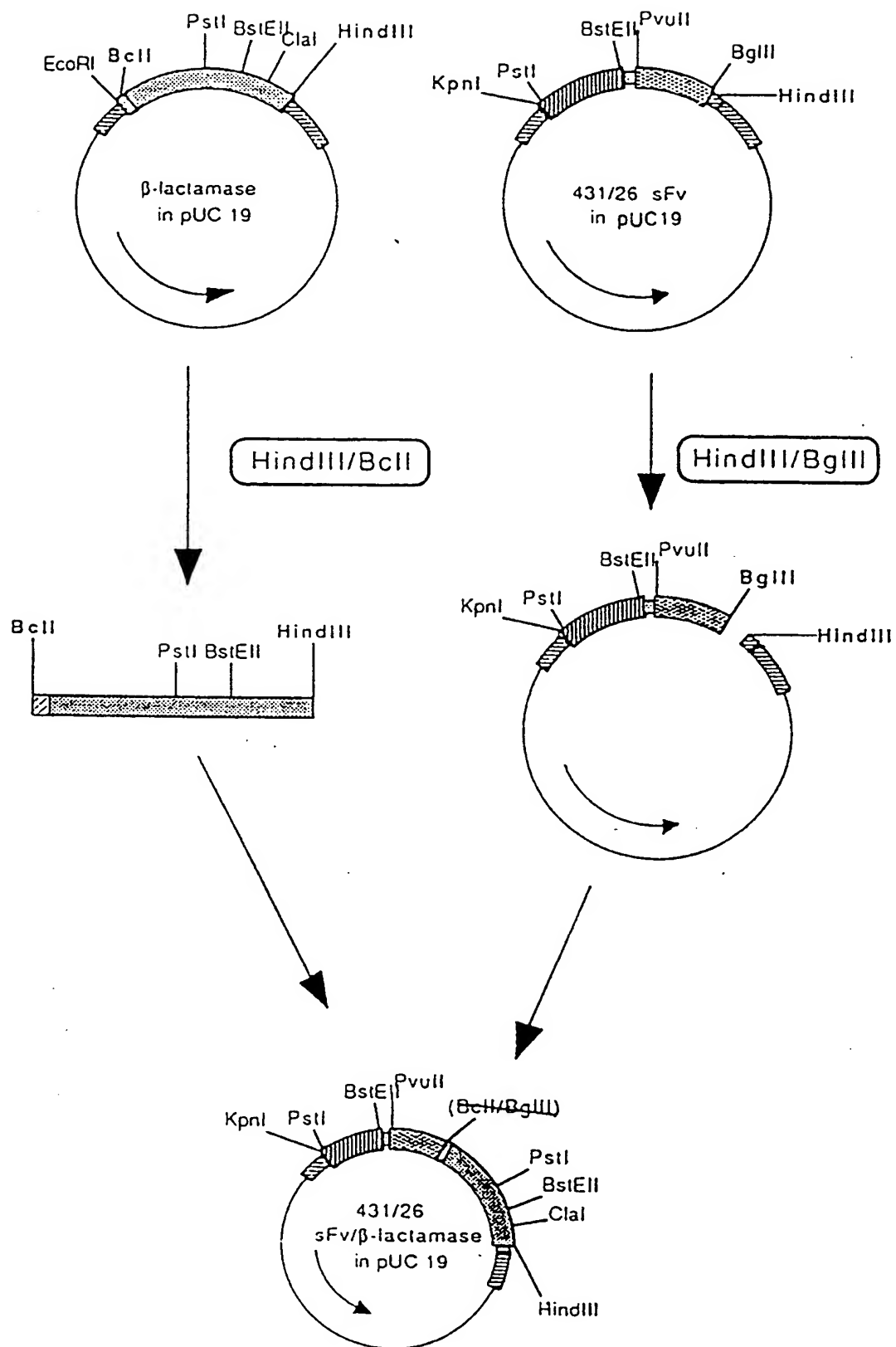




Abb.: 11

